

Checkpointkontrolle und Reparatur Heterochromatin-assoziiierter DNA-Doppelstrangbrüche in bestrahlten G2-Phase Zellen

**Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt
zur**

**Erlangung des akademischen Grades
eines Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)**

genehmigte Dissertation von

**Dipl.-Biochem. Olivia Barton
aus Heilbad Heiligenstadt**

**Darmstadt 2010
D17**

Referent: Prof. Dr. Markus Löbrich
Koreferent: Prof. Dr. Paul Layer

Tag der Einreichung: 01. April 2010
Tag der mündlichen Prüfung: 28. Mai 2010

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2006 bis März 2010 am Institut für Biophysik und am Institut für Biochemie der Universität des Saarlandes sowie in der Abteilung Strahlenbiologie und DNA-Reparatur der Technischen Universität Darmstadt unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Markus Löbrich angefertigt.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VI
TABELLENVERZEICHNIS	IX
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	X
1. EINLEITUNG	1
1.1. Zellzyklus und Zellzykluskontrolle	1
1.1.1. Der Zellzyklus	1
1.1.2. Zellzykluskontrolle	2
1.1.3. Der G2/M-Checkpoint	3
1.2. Das p53-Protein	5
1.3. Zelluläre Antwort auf DNA-Schäden	6
1.3.1. Strahleninduzierte Schäden der DNA	7
1.3.2. DNA-Schadenserkennung	8
1.3.3. Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen	9
1.3.3.1. Die Homologe Rekombination (HR)	10
1.3.3.2. Das Non-Homologous-End-Joining (NHEJ)	12
1.4. Das Artemis-Potein	14
1.5. Die Proteinkinase ATM (<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>)	16
1.6. Heterochromatin	17
1.6.1. Zusammensetzung des Chromatins	17
1.6.2. Der Heterochromatin-bildende Faktor Kap1	18
1.7. Das CtBP-interagierende Protein CtIP	20
1.8. Aufgabenstellung	21
2. MATERIALEN	23
2.1. Vektoren	23
2.2. Primer	24
2.2.1. Mutageneseprimer	24
2.2.2. Sequenzierprimer	24
2.3. Enzyme	25
2.4. siRNA	25
2.5. Inhibitoren	25
2.6. Antikörper	26
2.6.1. Primärantikörper	26
2.6.2. Sekundärantikörper	28
2.7. Längenstandards	28
2.8. kommerziell erhältliche Kits	28
2.9. Transfektionsreagenzien	29
2.10. Chemikalien	29
2.11. Bakterienstämme und Zelllinien	30
2.11.1. Bakterienstämme	30
2.11.2. Zelllinien	30

2.12. Lösungen, Puffer und Medien	31
2.12.1. für molekularbiologische Methoden	31
2.12.2. für zellbiologische Methoden	33
2.13. Verbrauchsmaterialien	35
2.14. Geräte	36
2.15. Software und Onlineprogramme	38
3. METHODEN	39
3.1. molekularbiologische Methoden	39
3.1.1. Herstellung kompetenter Zellen (RbCl-Methode)	39
3.1.2. Transformation von <i>E.coli</i> DH5 α	39
3.1.3. Animpfen einer Vor- bzw. Hauptkultur	40
3.1.4. Anlegen eines Glyzerinstocks	40
3.1.5. Plasmidpräparation	40
3.1.5.1. Minipräparation	40
3.1.5.2. Maxipräparation	41
3.1.6. Bestimmung der DNA-Konzentration	42
3.1.7. Mutagenese - PCR	42
3.1.8. <i>DpnI</i> -Verdau	43
3.1.9. Agarosegelelektrophorese	44
3.1.10. Sequenzierung	44
3.2. zellbiologische Methoden	45
3.2.1. Auftauen von humanen Zelllinien	45
3.2.2. Kultivierung von humanen Zelllinien	45
3.2.2.1. Passagieren von humanen Zelllinien	45
3.2.2.2. Zellzahlbestimmung	45
3.2.2.3. Aussäen der humanen Zelllinien in kleine und mittlere Zellkulturschalen sowie in kleine Kulturflaschen (25 cm ²)	46
3.2.3. Transiente Transfektion humaner Zelllinien	46
3.2.3.1. Transfektion von siRNA mit dem „HiPerfect Transfection Reagent“	46
3.2.3.2. Transfektion von Plasmid-DNA mit „Effectene Transfection Reagent“	47
3.2.3.3. Transfektion von Plasmid-DNA und siRNA mit dem Nucleofector von Amaxa	48
3.2.4. Röntgenbestrahlung	48
3.2.5. Behandlung mit spezifischen Proteininhibitoren	49
3.2.6. Durchflusszytometrische Methoden	49
3.2.6.1. Zellernte und Fixierung für Durchflusszytometrie	49
3.2.6.2. phospho-H3 / Propidiumiodid-Färbung	50
3.2.6.3. Messung am Durchflusszytometer	50
3.2.7. Immunologische Methoden	51
3.2.7.1. Fixierung der Zellen mit Formaldehyd	51
3.2.7.2. Rad51/ γ H2AX - Doppelfärbung	51
3.2.7.3. BrdU-Resektion/CENP-F - Doppelfärbung	52
3.2.7.4. BrdU-Einbau/CENP-F - Doppelfärbung	52
3.2.7.5. Auswertung der immunologischen Methoden	53

3.2.8. Proteinanalytische Methoden	54
3.2.8.1. Zellernte und Zellyse	54
3.2.8.2. Proteingehalt-Bestimmung nach Bradford	54
3.2.8.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	55
3.2.8.4. Western Blot	56
3.2.8.5. Immunpräzipitation.....	57
3.2.8.6. cdc25C Aktivitätstest.....	58
4. ERGEBNISSE	60
4.1. Rolle von p53 am G2/M-Checkpoint	60
4.1.1. Untersuchung zur Rolle von p53 am G2/M-Checkpoint bei einer Strahlendosis von 1 Gy	60
4.1.2. Untersuchung des unvollständigen Einsetzens des G2/M-Checkpoints in p53-/- Zellen	63
4.1.3. Untersuchung zur Rolle von p53 am G2/M-Checkpoint bei einer Strahlendosis von 12 Gy	64
4.1.4. Untersuchung der Rolle von p53 am G2/M-Checkpoint auf Proteinebene bei einer Strahlendosis von 1 Gy	67
4.1.5. Weiterführende Untersuchung zur Aufhebung des G2/M-Checkpoints in p53-/- Zellen	70
4.2. Funktion von p53 bei der Reparatur in G2.....	73
4.2.1. Anwendung der γ H2AX-Analyse zur Charakterisierung der DNA-Reparatur in exponentiell wachsenden humanen Zellen.....	74
4.2.2. Untersuchung des Einflusses verschiedener Proteine auf die Doppelstrangbruch-Reparatur mittels γ H2AX-Foci-Analyse.....	77
4.2.3. Anwendung der Rad51-Foci-Analyse zur Charakterisierung der HR in G2- Zellen	80
4.2.4. Untersuchung des Einflusses verschiedener Proteine auf die DSB-Resektion und DSB-Reparatur in der G2-Phase mittels Rad51-Foci-Analyse	82
4.3. Die Rolle von Artemis und ATM in der Reparatur von Strahleninduzierten DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs).....	84
4.3.1. Untersuchung des Einflusses von Artemis und ATM auf die DSB-Reparatur mittels γ H2AX- und Rad51-Foci-Analyse	85
4.3.2. Charakterisierung der Resektion von DSBs anhand der Analyse von BrdU- Resektions-Foci.....	87
4.3.3. Untersuchung der Rolle von Artemis und ATM bei der HR in G2-Zellen anhand der Analyse von BrdU-Resektions-Foci.....	89
4.3.4. Charakterisierung der HR anhand der Analyse von BrdU-Einbau-Foci.....	91
4.3.5. Untersuchung der Rolle von Artemis und ATM bei der HR in G2-Zellen anhand der Analyse von BrdU-Einbau-Foci	92
4.4. Einfluss des Heterochromatins auf die HR.....	94
4.4.1. Untersuchung des Einflusses des Heterochromatins auf die ATM-abhängige Reparatur	94
4.4.2. Untersuchung zur Wahl des Reparaturweges in Abhängigkeit vom Heterochromatinstatus	96

4.5. Einfluss von CtIP auf die Reparatur in G1 und G2	100
4.5.1. Charakterisierung der CtIP-abhängigen Reparatur	100
4.5.2. Untersuchungen zum Einfluss von CtIP auf die Artemis- und ATM- abhängige Reparatur in der G2-Phase.....	101
4.5.3. Untersuchungen zum Einfluss von CtIP auf die Artemis- und ATM- abhängige Reparatur in der G1-Phase.....	104
4.5.4. Untersuchungen zum Einfluss der Resektion von DSBs auf die Artemis- und ATM-Abhängigkeit nach Transfektion von CtIP-Mutanten in der G2-Phase.....	106
4.5.5. Untersuchungen zum Einfluss der Resektion von DSBs auf die Artemis- und ATM-Abhängigkeit nach Transfektion von CtIP-Mutanten in der G1-Phase.....	109
4.5.6. Einfluss von Roscovitin auf die Artemis-abhängige Reparatur.....	111
5. DISKUSSION	114
5.1. Funktion von p53 am G2/M-Übergang nach ionisierender Bestrahlung ...	114
5.1.1. Einfluss des p53-Status auf den G2/M-Checkpoint	114
5.1.2. Einfluss von p53 auf die am G2/M-Übergang beteiligten Proteine Cdc25C und Plk1	116
5.1.3. Einfluss von p53 auf die Checkpointkinasen (Chk1/Chk2)	119
5.1.4. Die Rolle von p53 bei der Reparatur strahleninduzierter Doppelstrang- brüche	120
5.1.4.1. Charakterisierung von NHEJ und HR	121
5.1.4.2. Der Einfluss von p53 auf die Reparatur strahleninduzierter DSBs.....	122
5.1.5. Ausblick.....	125
5.2. Rolle von ATM und Artemis bei der Reparatur von strahleninduzierten DNA-Schäden	127
5.2.1. Spezifischer Nachweis der HR	127
5.2.2. Rolle von Artemis und ATM bei der DSB-Reparatur in der G1- und der G2- Phase	128
5.3. Die Wahl des Reparaturweges in der G2-Phase	130
5.3.1. Einfluss der DSB-Endresektion auf die Wahl des Reparaturweges	130
5.3.2. Einfluss des Heterochromatinstatus auf die Wahl des Reparaturweges ...	132
5.3.3. Überlegungen zur Wahl des Reparaturweges in Abhängigkeit vom Heterochromatin	134
5.3.4. Modell zur Wahl des Reparaturweges in G2	136
5.4. Einfluss der DSB-Endresektion auf die Reparatur strahleninduzierter DSBs	137
5.4.1. Einfluss der DSB-Endresektion auf die Artemis- und ATM-abhängige Reparatur	137
5.4.3. Regulation von CtIP in der G1- und G2-Phase.....	139
5.4.4. Der funktionelle Beitrag von Artemis bei der Reparatur resektierter strahleninduzierter DNA-Doppelstrangbrüche	141
5.4.5. Die Rolle von ATM bei der Reparatur resektierter strahleninduzierter DNA- Doppelstrangbrüche	142
5.4.6. Ausblick	144
6. ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY	148

7. LITERATURVERZEICHNIS	152
8. ANHANG	168
8.1. Veröffentlichungen	168
8.2. Danksagung	169
8.3. Lebenslauf	170
8.4. Eidesstattliche Versicherung	171

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1. Schematische Darstellung der Zellzyklusphasen und deren Kontrolle durch CDK/Cyclin-Komplexe	1
Abb. 1.2. Regulation eines CDK/Cyclin-Komplexes.....	2
Abb. 1.3. Der G2/M-Checkpoint nach Auftreten eines DNA-Schadens.....	4
Abb. 1.4. Zellzyklusphasen-spezifische Reparaturwege.....	10
Abb. 1.5. Schematische Darstellung der Homologen Rekombination (HR)	12
Abb. 1.6. Schematische Darstellung des Non-Homologous End-Joining (NHEJ).....	14
Abb. 1.7. schematische Darstellung einer Chromatinfaser	17
Abb. 1.8. Schematische Darstellung von Eu- und Heterochromatin und ihrer Modifikationen.....	18
Abb. 1.9. Schematische Darstellung der Proteinstruktur des humanen Kap1.....	19
Abb. 1.10. Schematische Darstellung der Proteinstruktur des humanen CtIP	20
Abb. 2.1. schematische Vektorkarte des Plasmids pEGFP_CtIP-wt_C1	23
Abb. 2.2. schematische Vektorkarte des Plasmids pEGFP_CtIP-T847A_C1	23
Abb. 3.1. schematische Darstellung der QuickChange™ Site-Directed Mutagenesemethode	42
Abb. 3.2. schematische Darstellung des Tank-Blots.....	56
Abb. 3.3. schematischer Ablauf der Immunpräzipitation	58
Abb. 3.4. Phosphatase – FDP/ Fluorescein Farbreaktion	58
Abb. 4.1. Einfluss von Röntgenstrahlung auf den G2/M-Checkpoint exponentiell wachsender humaner Tumorzellen mit unterschiedlichem p53-Status	62
Abb. 4.2. Einfluss von Nocodazol auf den mitotischen Index exponentiell wachsender humaner Tumorzellen mit unterschiedlichem p53-Status	64
Abb. 4.3. Einfluss von 12 Gy Röntgenstrahlung auf den G2/M-Checkpoint exponentiell wachsender humaner Tumorzellen mit unterschiedlichem p53-Status ..	65
Abb. 4.4. Einfluss von 12 Gy Röntgenstrahlung auf den G2/M-Checkpoint exponentiell wachsender humaner Tumorzellen mit unterschiedlichem p53-Status ..	66
Abb. 4.5. Nachweis des G2/M-Checkpoints anhand von cdc25C bei exponentiell wachsenden humanen Tumorzellen mit unterschiedlichem p53-Status	69
Abb. 4.6. Einfluss von Chk1/Chk2-Inhibitor auf den G2/M-Checkpoint exponentiell wachsender humaner Tumorzellen mit unterschiedlichem p53-Status	72

Abb. 4.7. Identifizierung der Zellzyklusphasen in exponentiell wachsenden humanen Tumorzellen	75
Abb. 4.8. Einfluss verschiedener Proteine auf die DNA-Reparatur in exponentiell wachsenden humanen Tumorzellen	78
Abb. 4.9. Einfluss des p53-Status auf die DSB-Reparatur exponentiell wachsender humaner Tumorzellen	80
Abb. 4.10. Rad51-Foci als Marker für die Resektion der DSBs	81
Abb. 4.11. Einfluss verschiedener Proteine auf die DSB-Resektion in der G2-Phase exponentiell wachsender humaner Tumorzellen.....	83
Abb. 4.12. Einfluss des p53-Status auf die DSB-Resektion in der G2-Phase exponentiell wachsender humaner Tumorzellen.....	84
Abb. 4.13. Einfluss verschiedener Proteine auf die DNA-Reparatur in exponentiell wachsenden humanen Tumorzellen	86
Abb. 4.14. Nachweis der DSB-Resektion anhand der Analyse von BrdU-Resektions-Foci	88
Abb. 4.15. Einfluss verschiedener Proteine auf die DSB-Resektion in G2 exponentiell wachsender humaner Tumorzellen anhand der Analyse von BrdU-Resektions-Foci	90
Abb. 4.16. Nachweis erfolgter homologer Rekombination anhand der Analyse von BrdU-Einbau-Foci	92
Abb. 4.17. Einfluss verschiedener Proteine auf die homologe Rekombination anhand der Analyse von BrdU-Einbau-Foci in exponentiell wachsenden humanen Tumorzellen	93
Abb. 4.18. Einfluss des Heterochromatinstatus auf die Reparatur in der G1- und G2-Phase ATM-depletierter Zellen	96
Abb. 4.19. Einfluss des Heterochromatinstatus auf die Reparatur in HR-depletierten Zellen	97
Abb. 4.20. Einfluss des Heterochromatinstatus auf die HR-spezifische Reparatur in HR-depletierten Zellen	99
Abb. 4.21. DNA-Reparatur in CtIP-depletierten Zellen nach strahleninduzierten Schäden.....	101
Abb. 4.22. DNA-Reparatur in Art/CtIP- und ATM/CtIP-depletierten Zellen nach strahleninduzierten Schäden in der G2-Phase	103
Abb. 4.23. DNA-Reparatur in Art/CtIP- und ATM/CtIP-depletierten Zellen nach strahleninduzierten Schäden in der G1-Phase	105
Abb. 4.24. Darstellung der CtIP-Konstrukte	107

Abb. 4.25. DNA-Reparatur in CtIP-komplementierten Art/ATM-depletierten HeLa-S3-Zellen nach strahleninduzierten Schäden in der G2-Phase	109
Abb. 4.26. DNA-Reparatur in CtIP-komplementierten Art/ATM-defizienten HeLa-S3-Zellen nach strahleninduzierten Schäden in der G1-Phase	111
Abb. 4.27. DNA-Reparatur in mit Roscovitin behandelten 82-6hTert- und CJhTert-Zellen	113
Abb. 5.1. Modell zum Einfluss von CtIP und Kap1 auf die Wahl des	137

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1. siRNAs und ihre Sequenzen.....	25
Tab. 3.1. Zusammensetzung eines Mutagenese-PCR-Ansatzes	43
Tab 3.2. Mutagenese-PCR-Programm	43
Tab. 3.3. definierte Zellzahl verschiedener humaner Zelllinien zum Aussäen in kleine (8,8 cm ²), mittlere (21,5 cm ²) und große (60,1 cm ²) Zellkulturschalen sowie kleine Zellkulturflaschen (25 cm ²).....	46
Tab. 3.4. Einzusetzende Menge an Zellkulturmedium ohne Zusätze, siRNA und Hiperfect für die siRNA-Transfektion von humanen Zelllinien.....	47
Tab. 3.5. Einzusetzende Menge und Inkubationszeit von verschiedenen siRNA	47
Tab. 3.6. Zusammensetzung für verschieden prozentige Trenngele und das Sammelgel.....	55

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATR	<i>ATM and Rad3 related</i>
bp	Basenpaar
BrdU	5-Bromo-2'-desoxy-Uridin
BRCA	<i>breast cancer early onset</i>
BSA	bovines Serumalbumin
CDK	Cyclin-abhängige Kinase (<i>cyclin-dependent protein kinases</i>)
CENP-F	Centromer protein F
Chk1/2	Checkpoint-Kinase 1/2
CtIP	CtBP-Interacting Protein
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DDP	Diamminplatinum(II)dichlorid
DMEM	DULBECO'S MEM
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
DNA-PK	<i>DNA dependet protein kinase</i>
DNA-PKCS	<i>DNA dependet protein kinase catalytic subunit</i>
DSB	DNA-Doppelstrangbruch (<i>double-strand break</i>)
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluorescence Activated Cell Scanning
FCS	Fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	grün fluoreszierendes Protein
Gy	Gray (Einheit der Strahlendosis)

h	Stunde
HCl	Salzsäure
HR	homologe Rekombination
IF	Indirekte Immunfluoreszenz
IgG	Immunoglobulin G
IR	Ionisierende Strahlung (<i>ionizing radiation</i>)
Kan	Kanamycin
KAP-1	<i>KRAB associated protein 1</i>
Lb	Luria Broth
Lig	Ligase
mA	Milliamper
Mbp	Megabasenpaare
MEM	Minimal essential medium
Min	Minute
MRN	Proteinkomplex aus MRE11, RAD50 und NBS1
MW	Molekulargewicht (<i>molecular weight</i>)
Nbs	<i>Nijmegen Breakage Syndrome</i>
NEAA	Nicht-essentielle Aminosäuren (<i>non-essential amino acids</i>)
NHEJ	Nichthomologe Endverknüpfung (<i>non-homologous end-joining</i>)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PI	Propidiumiodid
PP2A	Protein-Phosphatase 2 α
P/S	Penicillin/Streptomycin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Rb	Retinoblastoma Protein
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNAse	Ribonuklease
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RPA	Replikations-Protein A
RT	Raumtemperatur
S	Serin
SCE	Schwesterchromatidenaustausch
SDS	Natriumdodecylsulfat

SDS-PAGE	denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese
siRNA	<i>Small interference RNA</i>
ssDNA	einzelsträngige DNA (<i>single stranded DNA</i>)
T	Threonin
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	internationale Enzymaktivitätseinheit (<i>unit</i>)
V(D)J	Variable (Diversity) Joining
v/v	volume per volume (Volumenprozent)
VE-Wasser	Wasser voll entmineralisiert
w/v	weight per volume (Gewichtsprozent)
wt	Wildtyp

Zytoplasmas (Zytokinese). Nach Abschluss der Mitose befinden sich die Tochterzellen wieder in der G1-Phase, wobei der Zellzyklus erneut beginnt oder die Zellen in die sogenannte Ruhephase (G0) übergehen. Die G0-Phase ist eine Art Zellzyklusarrest, die jederzeit durch Stimulation aufgehoben werden kann, so dass die Zelle wieder in den Zellzyklus eintritt (Denhardt et al. 1986).

1.1.2. Zellzykluskontrolle

Der Zellzyklus ist ein gut kontrollierter Mechanismus, der auf Komplexen aus Cyclinen und Cyclin-abhängigen Kinasen (*cyclin dependent kinases*, CDK) basiert (Pines 1995). Die CDKs bilden die katalytischen Untereinheiten der Komplexe und können erst nach Bindung der regulatorischen Untereinheit, den sogenannten Cyclinen, aktiviert werden. Cycline werden zellzyklusphasenspezifisch synthetisiert und am Ende derselben Phase wieder abgebaut. Die CDK/Cyclin-Komplexe unterscheiden sich somit innerhalb der jeweiligen Zellzyklusphasen. So interagiert in der G1-Phase das CyclinD mit der CDK4 bzw. der CDK6 (Weinberg 1995), während in der G2-Phase das CyclinA an die CDK1 bindet (siehe Abb. 1.1.). Sowohl der Übergang von einer in die nächste Zellzyklusphase als auch der Ablauf der einzelnen Phasen werden von den Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) reguliert. Die Kontrolle des Zellzyklus unterliegt somit einem komplexen Mechanismus. Die CDK/Cyclin-Komplexe werden selbst durch Kinasen (*cyclin activating kinases*, CAK) und Phosphatasen (Mitglieder der Cdc25-Familie) reguliert, und infolge von Phosphorylierung/Dephosphorylierung wird zusätzlich eine Änderung der subzellulären Lokalisation hervorgerufen (Morgan 1995). Die inaktivierenden Phosphorylierungen werden von der Wee1-Kinase vorgenommen (Lundgren et al. 1991; Parker und Piwnicka-Worms 1992). Die Aktivierung der CDK/Cyclin-Komplexe erfolgt mittels Entfernung der inhibitorischen Phosphatreste durch die Mitglieder der Cdc25-Familie und der aktivierende Phosphorylierung durch die CAKs (Abb. 1.2.).

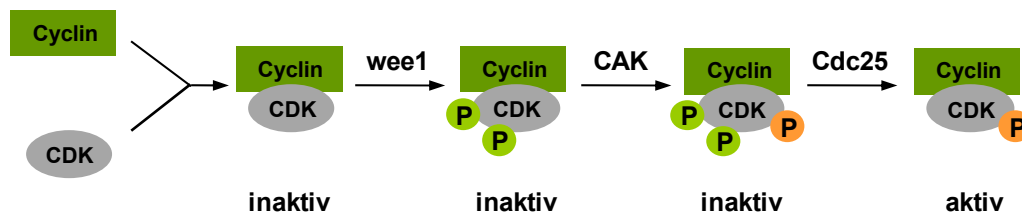


Abb. 1.2. Regulation eines CDK/Cyclin-Komplexes. Die inhibitorischen Phosphorylierungen sind in grün dargestellt und die aktivierende Phosphorylierung in orange.

Um sicherzustellen, dass die nächste Phase des Zellzyklus erst dann beginnt, wenn die vorhergehende Phase abgeschlossen ist, befinden sich innerhalb des Zellzyklus verschiedene Kontrollpunkte. Diese sind ebenfalls von großer Bedeutung, wenn in einer Zelle Schäden auftreten. Zur Gewährleistung einer möglichen Beseitigung dieses Schadens muss die Progression des Zellzyklus gestoppt oder zumindest verlangsamt werden (Zhou und Elledge 2000). Die bedeutendsten Kontrollpunkte befinden sich beim Übergang von der G1-Phase in die S-Phase (G1/S-Checkpoint) sowie beim Übergang von der G2-Phase in die Mitosephase (G2/M-Checkpoint) (Abb. 1.1.). Es existieren aber ebenso Zellzykluskontrollpunkte innerhalb einer Zellzyklusphase, sowohl in der S-Phase als auch in der Mitose. Die Regulation der Kontrollpunkte beruht ebenfalls auf CDK/Cyclin-Komplexen.

1.1.3. Der G2/M-Checkpoint

Der G2/M-Checkpoint bietet der Zelle die letzte Möglichkeit zur Reparatur von DNA-Schäden, bevor die Zellteilung stattfindet. Die Aktivierung des Checkpoints unterliegt einem schnell einsetzenden Mechanismus, der auf Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen beruht. Die Aufrechterhaltung basiert ebenfalls auf Phosphorylierungen/Dephosphorylierungen, aber gleichermaßen spielt ein vergleichsweise langsamer Mechanismus bei der Kontrolle eine Rolle. Dieser Mechanismus wird durch die Änderung des Transkriptionsmusters von Proteinen gesteuert.

Für den Übergang aus der G2-Phase in die Mitose ist der „*mitosis promoting factor*“ (MPF) von großer Bedeutung (Dunphy et al. 1988). Es handelt sich dabei um einen Komplex bestehend aus CyclinB und der CDK1, dessen Regulation auf einem Gleichgewicht zwischen Phosphorylierung und Dephosphorylierung des Threonin 14 und Tyrosin 15 der CDK1 beruht (Kumagai und Dunphy 1991, Morgan 1995). Die Verlagerung in Richtung Dephosphorylierung führt zur Aktivierung des Komplexes. Diese Reaktion wird von der Phosphatase Cdc25C ausgeübt. Beim Einsetzen des G2/M-Checkpoints wird der Übergang in die Mitose verhindert, da die durch die Ser/Thr-Kinasen Wee1, Mik1 und Myt1 inhibierenden Phosphorylierungen des CDK1/CyclinB-Komplexes nicht entfernt werden können (Lundgren et al. 1991, Müller et al. 1995).

Das Ausbleiben der Dephosphorylierung des CDK1/CyclinB-Komplexes nach Auftreten eines DNA-Schadens in der G2-Phase ist die Folge einer Signalkaskade der DNA-Schadensantwort. Dabei kommt es zunächst zur Aktivierung der Proteinkinase

ATM, die im weiteren Verlauf die Checkpointkinase 2 (Chk2) und indirekt auch die Checkpointkinase 1 (Chk1) phosphoryliert. Die aktivierten Chk1/Chk2 phosphorylieren nun die Phosphatase Cdc25C am Serin 216 (Peng et al. 1997, Sanchez et al. 1997). Das Serin 216 befindet sich in der Kernexportsequenz des Cdc25C. Die Phosphorylierung bewirkt die Bindung von Cdc25C an das 14-3-3-Protein, das den Transport aus dem Zellkern ins Zytoplasma vermittelt (Peng et al. 1997, Kumagai et al. 1998, Graves et al. 2001). Die Phosphorylierung des Serin 216 sowie die daraus resultierende Änderung der Lokalisation tragen zur Inaktivierung des Cdc25C bei. Folglich bleibt der MPF phosphoryliert und inaktiv, was den Übergang in die Mitose verhindert (Abb.1.3.).

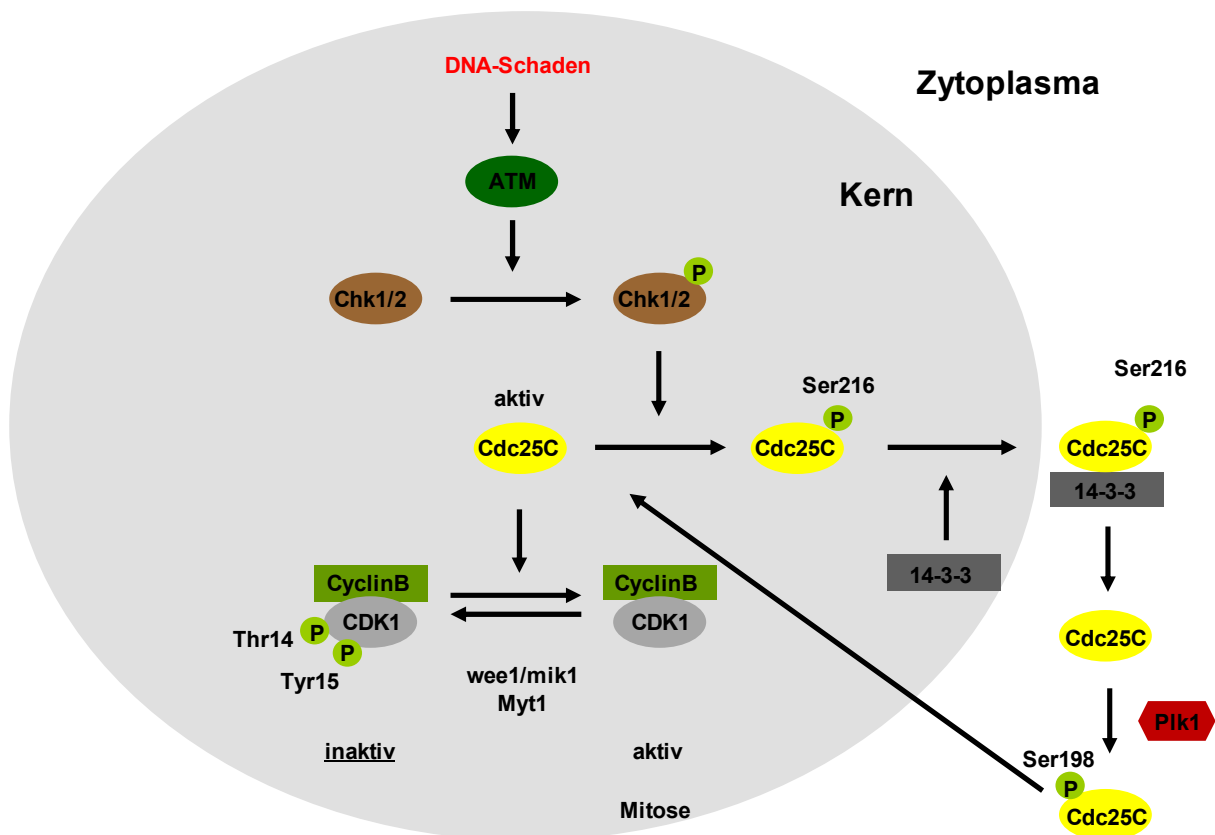


Abb. 1.3. Der G2/M-Checkpoint nach Auftreten eines DNA-Schadens. Nach Auftreten eines DNA-Schadens wird der Übergang in die Mitose durch eine Signalkaskade reguliert. Die Signalkaskade führt zur Phosphorylierung verschiedener Proteine sowie zum Transport des Cdc25C aus dem Zellkern (grau) in das Zytoplasma (weiß). Die Signalkaskade führt letztendlich zur Inaktivierung des CDK1/CyclinB-Komplex. Der G2/M-Checkpoint wird ebenfalls durch eine Signalkaskade aufgehoben. Dabei ist der Rücktransport von Cdc25C in den Zellkern von großer Bedeutung.

Die erfolgreiche Beseitigung des DNA-Schadens führt zum Wiedereintritt in den Zellzyklus. Auch dieser Schritt wird durch eine Phosphorylierungskaskade in Gang gesetzt, die nun zur Aktivierung des Cdc25C führt. Der genaue Mechanismus bei der Aktivierung des Cdc25C ist noch weitestgehend unverstanden und bedarf weiterer Untersuchungen. Es ist bekannt, dass das Serin 216 des Cdc25C im Zytosol de-

phosphoryliert wird und somit die Bindung zum 14-3-3-Protein aufgehoben wird. Welche Phosphatase diesen Prozess begünstigt, ist ebenfalls unklar. Aufgeklärt ist dagegen, dass das Cdc25C, trotz Dissoziation vom 14-3-3-Protein, im Zytoplasma verbleibt. Ein Rücktransport in den Zellkern wird erst durch eine Phosphorylierung des Serin 198 in der Kernexportsequenz des Cdc25C ermöglicht. Für diese Phosphorylierung ist die Polo-like-Kinase 1 (Plk1) verantwortlich (Toyoshima-Morimoto et al. 2002). Es ist jedoch noch weitestgehend unklar, ob das Cdc25C im Zellkern noch weiterer Aktivierungsschritte bedarf, bevor die inhibierenden Phosphatreste des CDK1/CyclinB-Komplexes abgespalten werden können. Der G2/M-Checkpoint kann aufgehoben werden und die Zellen treten in die Mitose über. Der biochemische Mechanismus am G2/M-Checkpoint wurde in Abb. 1.3. dargestellt.

1.2. Das p53-Protein

Eine zentrale Rolle für die Regulierung des Zellzyklus spielt das p53-Protein. Vor über 30 Jahren wurde p53 noch als Onkogen identifiziert (DeLeo et al. 1979), doch im Laufe der Zeit änderte sich das Bild von p53 drastisch. Vor allem nach dem Finlay et al. (1989) eine physiologische Funktion von p53 als Tumorsuppressor nachweisen konnten. Heute wird das p53-Protein als Transkriptionsfaktor vieler Gene beschrieben, die in die Signaltransduktion, den Wachstumsarrest, die DNA-Schadensantwort und die Apoptose involviert sind. Aufgrund dieser zahlreichen Funktionen bezeichnete Lane (1992) das p53 als „Wächter des Genoms“. Die Aktivierung beziehungsweise die Repression der Zielgene erfolgt durch Binden des p53-Proteins an deren Promotoren, zum einen an die im Promotor enthaltenden CDE/CHR-Elemente (Müller und Engeland 2010) oder zum anderen auch an spezifische p53-bindende Domänen (Clair und Manfredi 2006).

Das p53-Protein stellt einen wichtigen Sicherheitsmechanismus in der Zelle dar, daher bedarf es auch einer genauen Regulation von p53 in gesunden Zellen. Das p53-Gen unterliegt einer kontinuierlichen Expression, das heißt unabhängig von äußeren Einflüssen wird p53 exprimiert. Die Regulation der Menge des funktionalen p53-Proteins beruht auf einem Wechselspiel mit dem Onkogen Mdm2. In einer gesunden Zelle bindet Mdm2 an p53 und führt zu dessen Ubiquitinierung, so dass p53 anschließend abgebaut werden kann. Dies erklärt die geringe Halbwertszeit von p53 in primären Fibroblasten. Sind die Zellen nun Stressbedingungen, wie zum Beispiel UV-Licht oder ionisierender Strahlung, ausgesetzt, wird p53 durch die Proteinkinasen

ATM und ATR unter anderem am Serin 15 phosphoryliert, so dass Mdm2 nicht mehr binden kann. Als Folge des fehlenden Proteinabbaus wird das p53-Protein in der Zelle stabilisiert und angereichert, was zur Folge hat, dass mehr funktionales p53 vorhanden ist (Meek 2009).

Die verschiedenen Funktionen des p53-Proteins führen teilweise zu entgegengesetzten Effekten. Damit nicht alle Funktionen von p53 gleichzeitig initiiert werden, erfolgen je nach Art beziehungsweise Niveau des Schadens unterschiedliche Modifizierungen des p53-Proteins. Zu diesen Modifizierungen gehören Phosphorylierungen, Acetylierungen, Sumoylierungen und die Änderung der cis/trans-Konformation.

Je nach Schadensniveau hat die Aktivierung von p53 unterschiedliche Folgen. Bei geringen und reparablen Schäden in der Zelle kommt es zur Induktion eines Zellzyklusarrests, so dass die Zelle Zeit hat den Schaden zu beheben. Dieser Ablauf ist für den G1/S-Checkpoint beschrieben. Ohne p53 sind die Zellen nicht in der Lage den G1/S-Checkpoint zu induzieren (Kastan et al. 1992, Kuerbitz et al. 1992). Bei irreparablen DNA-Schäden löst die Aktivierung von p53 dagegen die Apoptose der Zelle aus, was deren Entartung und somit die Entstehung von Tumoren verhindert.

Aufgrund der zentralen Rolle von p53 bei der Regulation des Zellzyklus haben Mutationen im p53-Gen verheerende Folgen. So weisen weit über die Hälfte aller humanen Tumore Mutationen im p53-Gen auf. In diesen Zellen kann p53 seine Funktion als Tumorsuppressor nicht mehr ausüben. Dieser Defekt kann in Kombination mit weiteren Mutationen zur Entartung der Zellen führen.

1.3. Zelluläre Antwort auf DNA-Schäden

Schäden in der DNA können sowohl durch intrazelluläre Vorgänge, wie Meiose, Replikation oder V(D)J-Rekombination als auch durch exogene Agenzien, wie Chemotherapeutika, verschiedene Chemikalien und ionisierende Strahlung (IR) erzeugt werden. Die Antwort auf einen zellulären DNA-Schaden erfolgt durch eine Signaltransduktionskaskade. Sensorproteine erkennen die DNA-Schäden selbst oder die infolge der Schädigung entstandene Umstrukturierung des Chromatins und leiten das Signal an sogenannte Transducer-Proteine weiter. Diese verstärken das Signal und senden es an die Effektoren weiter, die je nach Art und Menge des Schadens unterschiedliche Reaktionen auslösen. So können in den Zellen Mechanismen zur Reparatur der DNA-Schäden aktiviert werden. Der induzierte Zellzyklusarrest bewirkt,

dass genügend Zeit für die Reparatur zur Verfügung steht. Auf irreparable Schäden reagiert die Zelle dagegen mit dem Einleiten der Apoptose.

1.3.1. Strahleninduzierte Schäden der DNA

Die Strahlenwirkung in einem biologischen System ist durch Wechselwirkung der Strahlung beziehungsweise der entstandenen Sekundärelektronen mit der DNA gekennzeichnet. Die Strahlung erzeugt in der Materie Sekundärelektronen, die Moleküle der DNA direkt ionisieren oder anregen, so dass kovalente Bindungen zerstört werden und DNA-Schäden auftreten können. Die Mehrzahl der Schäden entsteht jedoch durch indirekte Ionisation. Dabei interagieren die Sekundärelektronen mit dem Wasser der Zellen, wobei Hydroxylradikale entstehen. Diese sind zwar kurzlebig, haben jedoch eine hohe Reaktivität, so dass die DNA im Umfeld weniger Nanometer gleich mehrfach geschädigt werden kann. Die in einem lokal begrenzten Umfeld entstandenen einzelnen Schäden werden als *locally multiply damaged site* (LMDS) bezeichnet. Diese Schäden umfassen einen Bereich von ca. 20 Basenpaare (Hall et al. 2006).

Die Ionisation führt zur Induktion unterschiedlicher DNA-Schäden. Einen Großteil der entstandenen Schäden stellen Basenverluste, Basenänderungen und Einzelstrangbrüche (ESB) dar. Sie können leicht und schnell durch die Basenexzisionsreparatur beseitigt werden und haben somit keinen nennenswerten Einfluss auf das Überleben der Zelle (Ward 1995). Eine größere Gefahr geht von den entstandenen Doppelstrangbrüchen (DSBs) aus, bei denen beide DNA-Stränge durchtrennt sind. Die Reparatur der DSBs ist daher schwieriger (vergleiche Kapitel 1.3.3.). Können DSBs nicht repariert werden, hat dies Einfluss auf das Zellüberleben sowie die genomische Integrität. Beispielsweise werden bei einer Bestrahlung mit 1 Gy Röntgenstrahlung 1000 bis 2000 Basenschäden, 600 bis 1000 ESBs und 16 bis 40 DSBs produziert (Ward 1988).

Das Auftreten von DSBs sowie LMDS geht oft mit zusätzlichen Schäden an den DSB-Enden einher. So kommt es am 3'-Ende häufig zum Verlust der 3'-OH-Gruppe oder zum Anhängen von Phosphatresten bzw. Phosphoglycolaten an die OH-Gruppe (Henner et al. 1983). Aber auch die 5'-Enden weisen häufig Schäden auf. So führt der Verlust der Phosphatgruppe zur Schädigung des verbleibenden Zuckers. All diese Veränderungen an den Bruchenden erschweren die Reparatur, da einer Ligation

der Bruchenden zunächst einmal eine Prozessierung der Enden vorangehen muss (Hall et al. 2006).

1.3.2. DNA-Schadenserkennung

Die Erkennung der DSBs erfolgt über den MRN-Komplex (Mre11, Rad50 und Nbs1), der an die DSB-Enden bindet (D'Amours und Jackson 2002). Anschließend erfolgt die Rekrutierung weiterer Faktoren an die DSBs. Da die Kompaktheit der DNA die Rekrutierung der Reparaturfaktoren an die DSBs verhindert, müssen zunächst Faktoren rekrutiert werden, die zur Modellierung der Chromatinstruktur nach DNA-Schädigung beitragen. Dies können einerseits Chromatin-remodulierende Komplexe (Shim et al. 2005), von denen einige ATP-abhängig sind (Tsukuda et al. 2005), sein. Andererseits führen Modifikationen der Histone, wie Methylierung, Acetylierungen, Phosphorylierungen und Ubiquitinierung, zu einer besseren Erkennung von DNA-Schäden.

Die Hauptrolle der DNA-Schadensantwort spielt die Phosphorylierung der Histone, wodurch die Zugänglichkeit anderer Reparaturproteine an die geschädigte DNA ermöglicht und die Weiterleitung des Schadenssignals in der Zelle unterstützt wird. Eine dabei wichtige Phosphorylierung ereignet sich an der Histonvariante H2AX. Im Genom von Säugetierzellen liegen ca. 10 % der H2A-Population in Form des H2AX vor. Die Induktion eines DSBs führt in kürzester Zeit zur Phosphorylierung des Serinrestes 139 innerhalb des C-Terminus des H2AX. Diese resultierende phosphorylierte Form wird gammaH2AX (γ H2AX) genannt. Die Modifizierung des H2AX ist nicht auf ein Molekül beschränkt. Vielmehr kommt es aufgrund positiver Rückkopplung innerhalb eines 2 Mbp-Bereichs der DNA in der Umgebung des DSBs zur Phosphorylierung des H2AX (Rogakou et al. 1998). Das Serin 139 befindet sich vor einem Glutamin im C-Terminus des H2AX, welches die Substraterkennungssequenz (SQ-Motiv) für die Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase ähnlichen Kinasen (PIKK) darstellt. Zu der Familie der PIKK gehören beispielsweise ATM, ATR und die katalytische Untereinheit der DNA-PK (DNA-PKcs). Nachweislich können diese drei Kinasen das H2AX phosphorylieren (Stiff et al. 2004, Wang et al. 2005, Kinner et al. 2008, Löbrich et al. 2010). Die Rekrutierung des ATM an den DSB wird durch den MRN-Komplex initiiert (Petrini und Stracker 2003).

Wichtige Erkenntnisse zur Rolle von γ H2AX lieferten Experimente mit γ H2AX-defizienten Zellen. Diese verdeutlichten, dass γ H2AX nicht für die beginnende Aus-

bildung der durch spezifische Antikörper sichtbar gemachten DNA-Reparatur-Foci verantwortlich ist. Vielmehr bietet γ H2AX eine Plattform zur Stabilisierung dieser visualisierbaren DNA-Reparatur-Foci, in dem es zur Rekrutierung und zum Verbleib von Reparaturproteinen an den DSB beiträgt (Celeste et al. 2003).

1.3.3. Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen

Zur Beseitigung der DSBs stehen eukaryotischen Zellen zwei Reparaturwege zur Verfügung, das Non-Homologous-End-Joining (NHEJ) (vergleiche Kapitel 1.3.3.2.) und die Homologe Rekombination (HR) (siehe Kapitel 1.3.3.1.). In niederen Eukaryoten stellt die HR den Hauptweg der Reparatur dar und läuft in allen Zellzyklusphasen ab. In höher entwickelten Eukaryoten unterscheidet sich der Reparaturweg innerhalb der Zellzyklusphasen. Die HR kann nur bei Vorlage homologer Sequenzen wie den Schwesterchromatiden stattfinden. Daher ist die HR auf die S- und die G2-Phase beschränkt. Das NHEJ ist dagegen im gesamten Zellzyklus verfügbar, dominiert jedoch in der G1- und G2-Phase. Verschiedene Reparaturwege in einer Zellzyklusphase sorgen scheinbar für ein biphasisches Verhalten bei der Reparatur der DSBs (Metzger und Iliakis 1991). Sowohl in der G1- als auch in der G2-Phase wird innerhalb der ersten Stunden der Großteil der induzierten DSBs über eine schnelle Komponente der Reparatur beseitigt. Diese Reparatur wird durch das NHEJ bewältigt. Die DSBs, die mit einer langsamen Kinetik repariert werden, unterliegen zunächst einer Prozessierung der DSB-Enden. In der G2-Phase erfolgt die langsame Reparatur über die HR (Beucher et al. 2009), wogegen auch in der G1-Phase die langsame Reparatur über einen End-Joining-Weg erfolgt (Riballo et al. 2004) (vergleiche Abb. 1.4.).

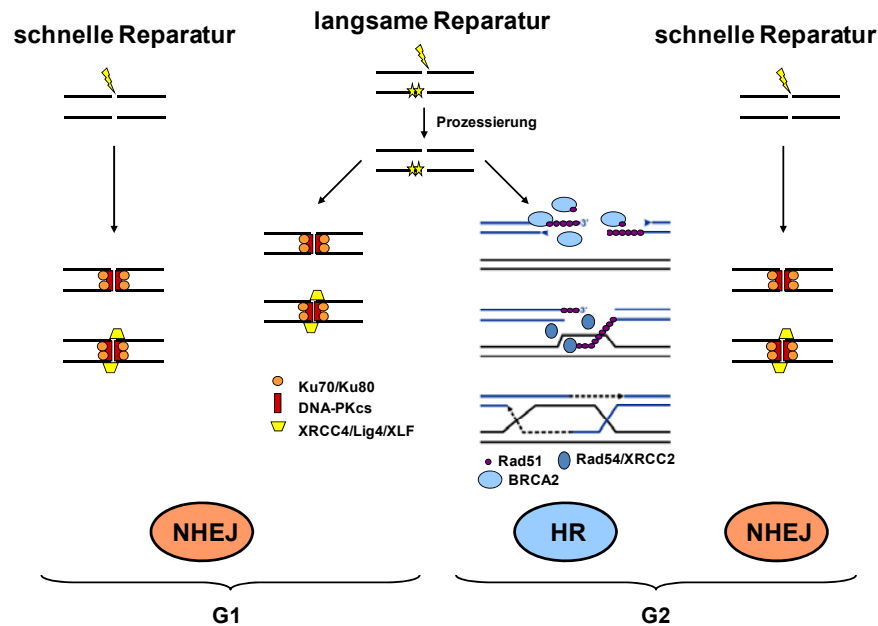


Abb. 1.4. Zellzyklusphasen-spezifische Reparaturwege. Die Reparatur der DSBs in G1 und G2 erfolgt in zwei Phasen, der schnellen und der langsamen Komponente. Das NHEJ stellt die schnelle Reparatur in G1 und G2 dar. Die langsame Komponente bedarf einer Prozessierung der DSBs. Anschließend werden die DSBs in G1 über das NHEJ repariert und in G2 werden die DSBs dem HR zugeführt.

1.3.3.1. Die Homologe Rekombination (HR)

Die HR ist der präzise Weg der Schadensbehebung, der durch homologe Sequenzen eine fehlerfreie Reparatur der DSBs sicherstellen kann. Diese homologen Sequenzen stammen in der Regel vom Schwesterchromatid ab, das in der S-Phase repliziert wird. Das Vorhandensein eines Schwesterchromatids grenzt somit die Verfügbarkeit der HR auf die späte S- und G2-Phase ein.

Die Erkennung des DSBs erfolgt über den MRN-Komplex, der sich aus Mre11, Rad50 und Nbs1 zusammensetzt (Tauchi et al. 2002, D'Armours und Jackson 2002). Die Anlagerung des Komplexes sorgt für eine räumliche Nähe der beiden Bruchenden. Die einzelnen Komponenten haben zudem weitere Funktionen. Das Nbs1 wird als Interaktionspartner mit ATM beschrieben. Die Bindung von Nbs1 an ATM führt zu dessen Aktivierung und somit zur Weiterleitung des Schadenssignals an benötigte Reparatur- und Checkpointproteine (Dupre et al. 2006). Darüber hinaus wird eine Beteiligung des MRN-Komplexes bei der Prozessierung einzelsträngiger DNA beschrieben. So konnte für das Mre11 sowohl eine Exo- als auch Endonukleaseaktivität nachgewiesen werden (Paull und Gellert 1998, Trujillo et al. 1998). Die Endonukleaseaktivität ist für die Prozessierung der DSB-Enden notwendig, jedoch scheint dabei die Interaktion mit CtIP unterstützend zu sein (Sartori et al. 2007) (siehe Kapi-

tel 1.7.). Die entstandenen 3'-Überhänge werden unmittelbar nach der Prozessierung vom Replikationsprotein A (RPA) erkannt. Die Bindung des RPAs stabilisiert die einzelsträngige DNA (*single stranded DNA*, ssDNA) und verhindert die Ausbildung von Sekundärstrukturen (Binz et al. 2004). Die einzelsträngigen Bereiche führen außerdem zur Aktivierung der Kinase ATR, dessen Substrat Chk1 daraufhin phosphoryliert wird. Das aktive Chk1 reguliert das Tumorsuppressorgen Brca2 (*BReast CAncer 2*) (Bahassi et al. 2008).

Brca2 ist neben Brca1 und Rad52 für die Übertragung von Rad51 auf die ssDNA zuständig, dabei muss das RPA verdrängt werden und es kommt zur Ausbildung eines Nukleoproteinfilaments (Thorslund und West 2007, Fillipo et al. 2008). Das Rad51-Protein ist zusammen mit Rad52 und Rad54 für die Suche homologer Sequenzen und der anschließenden Stranginvasion in das unbeschädigte Schwesterchromatid zuständig. Bei der Stranginvasion kommt es zur Ausbildung einer D-Schleife, wodurch nicht nur eine Polymerase I-vermittelte Synthese am eingedrungenen Strang sondern auch am 3'-Ende des nicht-invasiven Strangs erfolgen kann. Die Stranginvasion hat darüber hinaus die Ausbildung von Holliday-Junctions zur Folge, die nach Beenden der Synthese durch Helikasen (BLM, WRN) und Nukleasen (Mus81/Eme1) aufgelöst werden müssen (Iijima et al. 2008, Mimitou und Symington 2009). Dabei kann es zum Austausch von DNA zwischen den beteiligten DNA-Strängen kommen (sogenannte *sister chromatid exchange*, SCE). Eventuell auftretende Lücken werden aufgefüllt und die DNA-Stränge durch Ligase I miteinander verbunden. Der Ablauf der HR ist in Abb. 1.5. schematisch dargestellt.

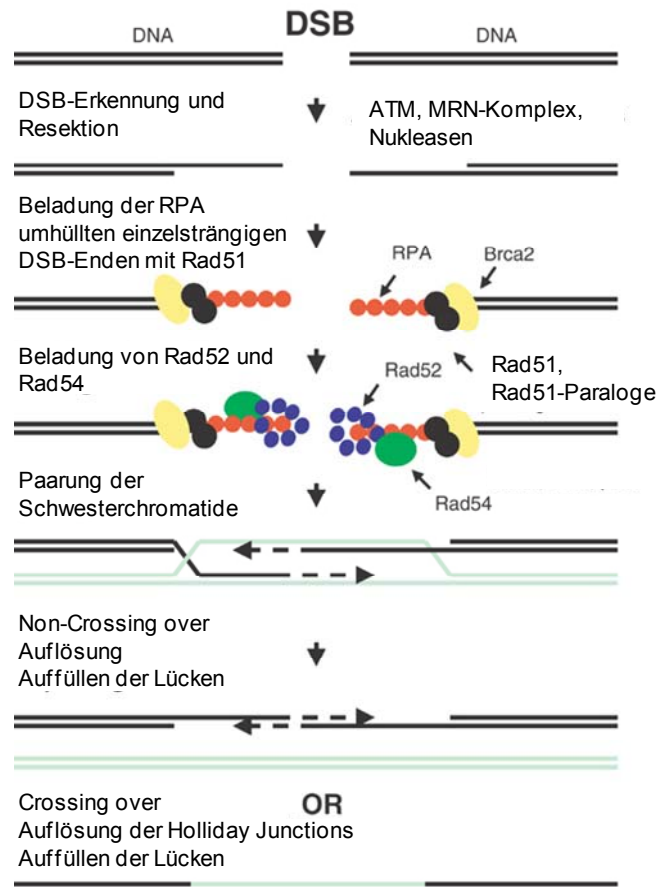


Abb. 1.5. Schematische Darstellung der Homologen Rekombination (HR)

Der DSB wird durch den MRN-Komplex erkannt und zusammen mit CtIP wird die Resektion der Bruchenden unterstützt. Die entstandene einzelsträngige DNA wird von RPA erkannt und stabilisiert. Brca2 verdrängt RPA und überträgt Rad51 auf den Einzelstrang. Zusammen mit Rad52 und Rad54 sucht das entstandene Nukleofilament nach homologen Sequenzen und es findet eine Stranginvasion statt, die zur Ausbildung von Holliday Junctions führt. Nach erfolgter Synthese werden die Holliday Junctions endonukleolytisch gespalten, dabei kann es zum Austausch von DNA kommen. Eventuell vorliegende Lücken werden aufgefüllt bevor die Enden ligiert werden. (aus: Valerie und Povirk 2003)

1.3.3.2. Das Non-Homologous-End-Joining (NHEJ)

Das NHEJ ist nicht nur bei der Reparatur exogen-induzierter DSBs von Bedeutung, sondern auch essentiell für DSBs, die während der V(D)J-Rekombination entstehen. Die Verknüpfung der gebrochenen DNA-Enden erfolgt über einen einfachen Reparaturmechanismus, für den kein Template mit ausgedehnten homologen Sequenzen benötigt wird. Diese Art der Reparatur ist nicht zwangsläufig exakt und fehlerfrei, so dass es durchaus zum Verlust einiger Nukleotide kommen kann.

Für das NHEJ werden zwei Kernkomplexe benötigt. Zum einen ist dies der Proteinkomplex DNA-PK, der sich aus den drei Komponenten Ku70, Ku80 und der DNA-PKcs zusammensetzt, und zum anderen der XRCC4/DNA-Ligase IV-Komplex (Jeggo 1998, Jackson 2002).

Der Prozess des NHEJ beginnt mit der Erkennung des DSBs und der Bindung des Heterodimers Ku70/Ku80 an jedes freie Bruchende. Die Bindung des Heterodimers erfolgt unter Ausbildung einer ringförmigen Struktur, in die die DNA eingefädelt wird (Walker et al. 2001). Neben dem Binden der Bruchenden besitzt der Ku70/80-Komplex eine weitere Aufgabe. Er ist weiterhin für die Rekrutierung der DNA-PKcs an die Bruchenden verantwortlich. Die DNA-PKcs hält die Bruchenden in räumlicher Nähe (de Fazio et al. 2002) und verdeckt die freien Enden, die so vor Nukleasen und Ligasen geschützt sind (Weterings et al. 2003). Bevor die Verknüpfung der Enden erfolgen kann, müssen diese freigegeben werden. Die Freigabe beruht auf der Phosphorylierung der beiden DNA-PK-Komplexe. Einerseits werden die zwei DNA-PK-Komplexe komplementärer Bruchenden autophosphoryliert (Ding et al. 2003, Block et al. 2004) und andererseits erfolgt ebenfalls eine Phosphorylierung der DNA-PK durch ATM, dessen Kinaseaktivität nach Auslösen der DNA-Schadensantwort aktiviert wurde (Chen et al. 2007). Nur die Kooperation beider Phosphorylierungen hat eine Konformationsänderung der DNA-PK-Komplexe zur Folge, die zur Freigabe der Bruchenden führt. Die Bruchenden sind nun für die weitere Prozessierung und die abschließende Verknüpfung zugänglich.

Die Ligation findet nach Aktivierung des XRCC4/DNA-Ligase IV-Komplexes durch die DNA-PK statt. Für den Ablauf der Ligation wurde ein weiterer NHEJ-Faktor identifiziert. Der XRCC4 like factor (XLF) unterstützt den XRCC4/DNA-Ligase IV-Komplex (Ahnesorg et al. 2006, Buck et al. 2006). Der genaue Mechanismus konnte bislang jedoch noch nicht ausreichend geklärt werden und bleibt im Fokus der Forschung. Abb. 1.6. zeigt somit eine mögliche schematische Darstellung des NHEJs.

Neben den Kernkomponenten des NHEJ werden viele weitere Faktoren mit diesem Reparaturweg in Verbindung gebracht. Durch ionisierende Strahlung entstehen nur selten DSBs mit glatten Enden, die Mehrheit der DSBs weisen komplizierte Strukturen auf. Diese können zusätzliche Phosphatreste oder Phosphoglycolate am 3'-Ende, Zucker- und Basenschäden sein. Bevor eine Ligation dieser DSBs möglich ist, muss eine Prozessierung der Enden erfolgen. Eine wesentliche Rolle im NHEJ wird dabei dem MRN-Komplex (Mre11-Rad50-Nbs1) zugeschrieben (Rass et al. 2009, Taylor et al. 2010). Ohne genaue Kenntnisse zu dessen Funktion in der G1-Phase wird angenommen, dass der MRN-Komplex bei der Schadenserkennung und der Initiation der DNA-Schadensantwort von Bedeutung ist, aber ebenfalls bei der Prozessierung der DSB-Enden beteiligt sein könnte. Ein weiterer möglicher Faktor ist die

Nuklease Artemis, für die eine Notwendigkeit während der Prozessierung der DSB-Enden beschrieben wurde. Artemis scheint dabei zusammen mit ATM an einem Unterweg des NHEJ beteiligt zu sein (Riballo et al. 2004).

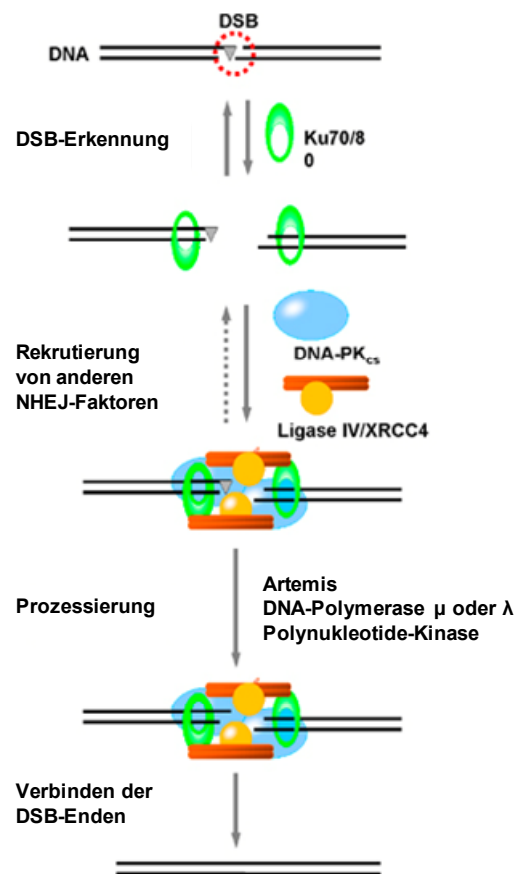


Abb. 1.6. Schematische Darstellung des Non-Homologous End-Joining (NHEJ)

Das Heterodimer Ku70/Ku80 bindet an die freien Bruchenden. Anschließend wird DNA-PKcs an den Bruch rekrutiert unter Ausbildung des DNA-PK-Holoenzym. Die freien Bruchenden werden in räumlicher Nähe gehalten und vor Degradation und Nukleasen geschützt. Die DNA-PK rekrutiert weiterhin den Ligationkomplex, bestehend aus XRCC4, LigaseIV und XLF, so dass die Bruchenden miteinander verknüpft werden können. (van Gent und van der Burg 2007)

1.4. Das Artemis-Potein

Die Entdeckung des Proteins Artemis erfolgte bei der Untersuchung einer Funktionsstörung des Immunsystems, die aufgrund von Mutationen in dessen Gen auftritt. Die Defekte im Artemisgen führen zu einer strahlensensitiven (*radiation-sensitive*, RS) Form der schweren, kombinierten Immundefizienz (*severe combined immuno deficiency*, SCID) (auch als RS-SCID bezeichnet). Diese ist klinisch ähnlich, aber pathogenetisch deutlich verschieden von dem DNA-Defekt, der in SCID-Mäusen beobachtet wird. Charakterisiert ist dieser Immundefekt durch den Verlust reifer T- und B-Lymphozyten (Moshous et al. 2001, Le Deist 2004). Die Mehrheit der Artemis-Mutationen ist in der katalytischen Domäne lokalisiert. Diese beruhen auf der Deleti-

on einiger Nucleotide oder ganzer Exons, die zur Inaktivierung des Artemis beitragen (Le Deist et al. 2004).

Artemis gehört zur Superfamilie der Metallo- β -Laktamasen und wurde zunächst als Komponente der V(D)J-Rekombination identifiziert. Diese genetische Rekombination ermöglicht die Bereitstellung einer großen Vielfalt von Immunglobulinen und T-Zell-Rezeptoren durch die Kombination verschiedener V-(*variability*)-, D-(*diversity*)- und J-(*joining*)- Segmente. Die V(D)J-Rekombination wird durch die Proteine Rag1 und Rag2 eingeleitet, wobei es zur Entstehung von Haarnadelstrukturen kommt (van Gent et al. 1996). Vor dem korrekten Verknüpfen der einzelnen Segmente durch den XRCC4/DNA-LigaseIV-Komplex müssen diese Strukturen entfernt werden. Artemis konnte eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität zugeschrieben werden. Erst durch die DNA-PK kann zusätzlich eine Endonukleasefunktion von Artemis initiiert werden, die für das Öffnen der Haarnadelstrukturen verantwortlich ist (Ma et al. 2002, Deist et al. 2004). Infolgedessen können die einzelnen Segmente durch die Kernkomponenten des NHEJs miteinander verknüpft werden.

Inzwischen konnte Artemis eine weitere Funktion bei der Reparatur von 10-15 % der strahleninduzierten DSBs in der G1-Phase zugeordnet werden (Riballo et al. 2004). Neuere Studien zeigen, dass Artemis ebenfalls bei der Reparatur einer Minderheit der strahleninduzierten DSBs in der G2-Phase beteiligt ist (Deckbar et al. 2007).

Im Folgenden soll die Funktion in der G1-Phase erläutert werden. Bei ionisierender Strahlung entstehen neben den glatten Bruchenden vermehrt modifizierte Enden (siehe Kapitel 1.3.1.), die vor der Verknüpfung durch die Kernkomponenten des NHEJs einer Prozessierung bedürfen. Die Bearbeitung dieser komplexen Bruchenden benötigt die Nukleaseaktivität von Artemis (Riballo et al. 2004, Jeggo und Löbrich 2005). Die Induktion einfacher Bruchenden, die durch das chemische Agens Etoposid erzeugt werden, bedarf dagegen keiner Nukleaseaktivität des Artemis (Riballo et al. 2004).

Reguliert wird Artemis sowohl von ATM als auch von DNA-PK (Riballo et al. 2004, Zhang et al. 2004, Poinsignon et al. 2004). Der DNA-PK konnte in der G1-Phase eine Rolle bei der Rekrutierung von Artemis an die Bruchenden nachgewiesen werden. Zusätzlich ist die DNA-PK für die Aktivierung der Endonukleaseaktivität von Artemis essentiell, die scheinbar aber nicht auf einer Phosphorylierung von Artemis beruht (Goodarzi et al. 2006).

In der Aminosäuresequenz von Artemis konnten vier SQ-Motive identifiziert werden, die nach niedrigen Dosen von IR durch die Proteinkinase ATM phosphoryliert werden (Geng et al. 2007). Die genaue Rolle von ATM im Artemis-abhängigen Reparaturweg ist jedoch weitestgehend unklar und bleibt im Fokus der Forschung. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass ATM-defiziente Zellen denselben Reparaturdefekt wie Artemis-defiziente Zellen in der G1-Phase aufweisen. Epistasis-Studien lassen darauf schließen, dass Artemis und ATM im selben Unterweg des NHEJs beteiligt sind (Riballo et al. 2004).

1.5. Die Proteinkinase ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*)

ATM gehört zur Familie der Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase-ähnlichen Kinasen (PIKK) und besitzt eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion nach Schädigung der DNA. Die katalytische Domäne liegt zwischen zwei FAT-Domänen im C-Terminus des Proteins. Diese Bereiche sind bei der Regulation der Kinasedomäne beteiligt. In der inaktiven Form liegt ATM als Homodimer vor, wobei die FAT-Domänen die Kinasedomäne des jeweiligen Bindungspartners blockieren. Es wird vermutet, dass nach Induktion eines DSBs Änderungen in der Chromatinstruktur auftreten, die die Autophosphorylierung des Homodimers am Serin 1981 in der FAT-Domäne zur Folge haben. Das Dimer dissoziiert in zwei aktive Monomere, die verschiedene Proteine mit der Erkennungssequenz S/T-Q, wie bei den Checkpointkinasen Chk1 und Chk2, phosphorylieren können (Bakkenist und Kastan 2003). Die Aktivierung von ATM infolge des Auftretens von DNA-Schäden begünstigt den Zellzyklusarrest und die Apoptose.

Mutationen im ATM-Gen führen zu einer selten auftretenden autosomal-rezessiv vererbten Erkrankung, der Ataxia telangiectasia (AT). Diese Krankheit ist durch einige klinische Merkmale wie neuronale Degeneration, zerebelläre Ataxien (charakteristische Erweiterung kleiner Arterien im Gesicht) und einer Immundefizienz gekennzeichnet. Entsprechend der zentralen Rolle von ATM in der DSB-Schadensantwort zeigen AT-Patienten eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Strahlung (Morgan und Kastan 1997, Takagi et al. 1998) und ein erhöhtes Krebsrisiko (Vorechovsky et al. 1996, Vo et al. 2005).

In jüngster Zeit wurde die zuvor postulierte (Kühne et al. 2004, Riballo et al. 2004) Funktion von ATM bei der Reparatur von DSBs bestätigt (Goodarzi et al. 2008). In den Phasen G1 und G2 werden die Mehrheit der DSBs unabhängig von ATM repa-

riert. Lediglich 10-15 % der induzierten DSBs in der G1-Phase benötigen ATM für die Reparatur. Dieser Anteil an DSBs wird mit einer langsamen Reparaturkinetik beseitigt und bedarf ebenfalls die Nuklease Artemis (Riballo et al. 2004). Auch für die G2-Phase konnte eine ATM-Abhängigkeit in der langsamen Reparatur beobachtet werden (Deckbar et al. 2007). Ebenfalls konnte in einem ATM-defizienten Hintergrund infolge von ionisierender Strahlung eine erhöhte Anzahl von Chromosomenaberrationen beobachtet werden (Deckbar et al. 2007).

1.6. Heterochromatin

1.6.1. Zusammensetzung des Chromatins

Im menschlichen Zellkern werden ca. 2 Meter diploide DNA durch Komprimierung in einem kleinen Volumen untergebracht. Die DNA windet sich um die Histon-Proteine und bildet die Basiseinheit des Chromatins, das Nukleosom. Die Histone formen dabei ein Oktamer, das sich aus jeweils 2 Exemplaren der Histone H2A, H2B, H3 und H4 zusammensetzt. Zwischen 2 Nukleosomen befindet sich die variable Linker-DNA. Die nukleosomale DNA ist dadurch dicht gepackt. Eine schematische Darstellung der Chromatinfaser ist in Abb. 1.7. gezeigt.

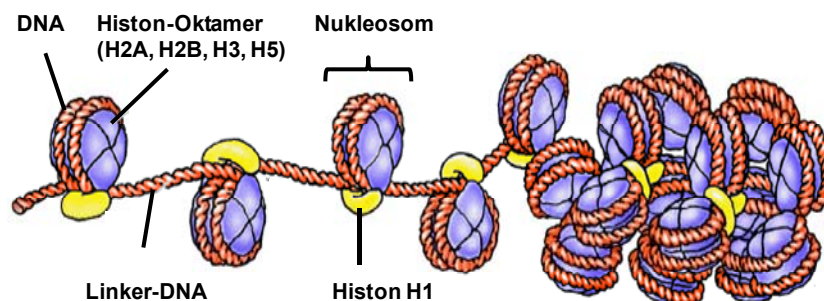


Abb. 1.7. schematische Darstellung einer Chromatinfaser. Die DNA (rot) ist um das Histon-Oktamer (violett) gewickelt. Der DNA-Histon-Komplex wird als Nukleosom bezeichnet. Diese Struktur wird durch das Histon H1 zusammengehalten. Die Chromatinfaser ist zu einer dickeren Faser zusammengefasst.

Je nach Grad der Packung unterscheidet man 2 Arten von Chromatin, das Heterochromatin und das Euchromatin. Die beiden Chromatinarten variieren weiterhin in der Modifizierung der Histone und der Anlagerung weiterer Proteine (Rea et al. 2000, Jenuwein und Allis 2001). Das Heterochromatin ist durch die Methylierung des Histons H3 an den Lysinen 9 und 27 und durch das Auftreten des Heterochromatin Protein 1 (HP1) gekennzeichnet (Lachner et al. 2001, Peters et al. 2003). Charakteristisch für euchromatische Bereiche ist dagegen die Acetylierung des Lysins 9 (Nicolas

et al. 2003) und die Methylierung der Lysine 4 und 36 im Histon 3 (Santos-Rosa et al. 2002, Bannister et al. 2005) (siehe Abb. 1.8.).

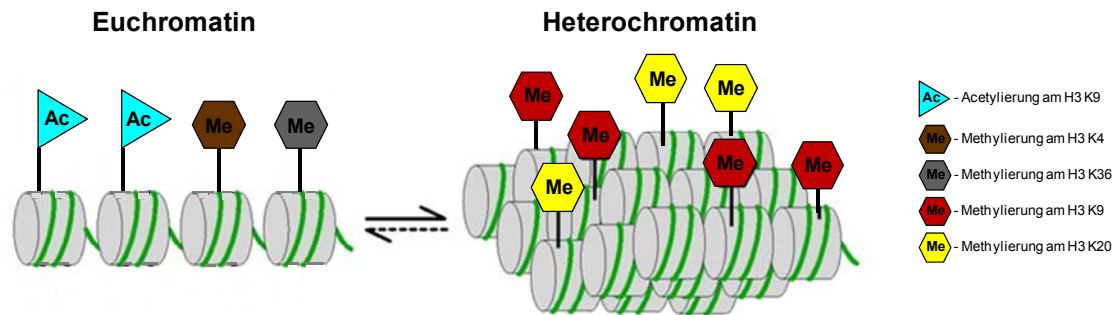


Abb. 1.8. Schematische Darstellung von Eu- und Heterochromatin und ihrer Modifikationen. Dargestellt ist die lockere Packung der DNA im Euchromatin, während die DNA im Heterochromatin stark kondensiert vorliegt und somit nicht ablesbar ist. Weiterhin sind einige spezifische Modifizierungen der Histone dargestellt. (aus Jenuwein und Allis 2001 und weiter modifiziert)

Wie in Abb. 1.8. zu erkennen, liegt die DNA im Euchromatin in einer locker gepackten, entspiralisierten Form vor. In diesen Bereichen findet fast die gesamte Genaktivität statt, da hier die meisten Gene codiert werden. Im Gegensatz dazu ist die DNA im heterochromatischen Bereich aufgrund seiner sehr dichten Packung nicht ablesbar. Brown (1966) unterscheidet das konstitutionelle und fakultative Heterochromatin. Die konstitutionelle Form ist durch sich ständig wiederholende Sequenzen gekennzeichnet, die vor allem in den Telomeren und den Zentromeren zu finden sind. Diese repetitiven Sequenzen erleichtern die Entstehung des Heterochromatins. Die starke Kondensierung in diesen Bereichen sorgt für eine dauerhafte Blockierung der Gene während der gesamten Lebensdauer eines Organismus. Das fakultative Heterochromatin ist dagegen nicht durch spezifische DNA-Sequenzen gekennzeichnet und ist vielmehr gewebespezifisch zu finden. So werden DNA-Sequenzen in den Gewebetypen, in denen sie nicht benötigt werden, still gelegt, während sie in anderen weiterhin zur Verfügung stehen. Bereits 1966 wurde von Brown postuliert, dass jede DNA-Sequenz potentiell zum fakultativen Heterochromatin verpackt werden kann. Das hierfür bekannteste Beispiel ist das inaktivierte X-Chromosom weiblicher Säugetiere (Barr-Körperchen).

1.6.2. Der Heterochromatin-bildende Faktor Kap1

In heterochromatischen Bereichen wird die Expression der Gene unterdrückt. Das am besten charakterisierte System zur Repression von Genen ist das *Krüppel-*

associated box zinc finger protein (KRAB-ZFB). Eine erfolgreiche Repression ist jedoch nur nach Assoziation mit dem KRAB-ZFP-assoziierten Protein 1 (Kap1) möglich. Dieses Protein gehört der Familie der *transcription intermediary factors* (TIF) von transkriptionellen Regulatoren an. Dabei bindet Kap1 mit einer sogenannten *RING finger-B box coiled-coil domain* (RBCC) im N-Terminus an das KRAB-ZFB. Die Bindung dieses Komplexes an die DNA erfolgt spezifisch über das KRAB-ZFB, da Kap1 nicht direkt an die DNA binden kann (Peng et al. 2000). Neben der RBCC-Domäne enthält Kap 1 weitere Bereiche zur spezifischen Rekrutierung und Bindung von benötigten Proteinen. So rekrutiert Kap1 das HP1-Protein durch ein PxVxL-(Prolin-X-Valin-X-Leucin-) Motiv in der HP1-bindenden Domäne zu den Histonen (Lechner et al. 2000). Weiterhin konnte eine Assoziation mit Methyltransferasen wie SETDB1 und Histondeacetylasen wie NuRD über die C-terminalen *plant homeodomain* (PHD) und die *bromodomain* (BD) nachgewiesen werden (Schultz et al. 2001, 2002). Das Kap1-Protein ist in Abb. 1.9. schematisch dargestellt.

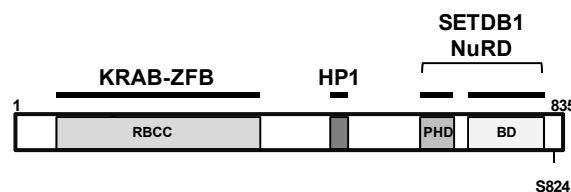


Abb. 1.9. Schematische Darstellung der Proteinstruktur des humanen Kap1

Im N-Terminus befindet sich die KRAB-bindende Domäne (*RING finger-B box coiled-coil domain* (RBCC)). Weiterhin sind die Bindungsdomänen für HP1, die Methyltransferase (SETDB1) und die Deacetylase (NuRD) eingezeichnet. Darüber hinaus ist die für die Kap1-anhängige Änderung des Heterochromatinstatus benötigte Phosphorylierungsstelle am Serin 824 dargestellt (nach Ziv et al. 2006).

Die spezifische Methylierung und Deacetylierung der Histone infolge der Rekrutierung der Methyltransferasen und der Deacetylasen sowie die Anlagerung des HP1 führen zur Hemmung der Genexpression durch Ausbildung des Heterochromatins (Sripathy et al. 2006).

Die Induktion eines DNA-Schadens führt zum Auslösen einer Schadensantwort, in deren Folge es zur Chromatin-Relaxation kommt. Erst durch die Relaxation wird die Erkennung des entstandenen Schadens durch die Reparaturproteine ermöglicht (Ziv et al. 2006). Infolge der DNA-Schadensantwort kommt es zur Aktivierung der Proteinkinase ATM (vergleiche Kapitel 1.5.), die folglich Kap1 am Serin 824 im Bereich des DNA-Schadens phosphoryliert. Diese Phosphorylierung kann neben ATM auch durch die anderen Mitglieder der PIKK-Familie, ATR und DNA-PK, erfolgen (White et al. 2006, Li et al. 2007). Im Bereich des DSBs kommt es so zur Dekondensierung des Heterochromatins. Die schadensabhängige Aktivierung von Kap1 dient somit

nicht als Sensor bzw. Aktivator der Schadensantwort. So hat die Phosphorylierung von Kap1 nach Ziv et al. (2006) weder Einfluss auf die Phosphorylierung von H2AX noch auf die ATM-Aktivierung.

Bisher wurde ein möglicher Einfluss des Chromatinstatus bei der DSB-Reparatur nicht berücksichtigt. Jüngste Studien von Goodarzi et al. (2008) weisen jedoch auf einen solchen Einfluss hin. So konnten Goodarzi et al. zeigen, dass die ATM-abhängigen DSBs in der G1-Phase im Heterochromatin zu finden sind. Die Reparatur dieser DSBs bedarf der Auflockerung des Heterochromatins, die durch ATM vermittelt wird.

1.7. Das CtBP-interagierende Protein CtIP

CtIP ist ein Kernprotein und wurde vor über zehn Jahren als Bindungspartner des transkriptionellen Supressors CtBP (*C-terminal Binding protein of Adenovirus E1A*) identifiziert (Schaeper et al. 1998). Dadurch erlangte es den Namen CtBP-interagierendes Protein (CtIP). Bald darauf konnte gezeigt werden, dass CtIP mit weiteren Kernproteinen (u.a. Mitglieder der Rb-Familie (Fusco et al. 1998) und Brca1 (Yu et al. 1998, Wong et al. 1998)) interagiert, die an der transkriptionellen Regulation und der Zellzykluskontrolle beteiligt sind. CtIP wurde daher zunächst eine Rolle bei der Regulation in der Tumorsuppression zugeschrieben.

Die Aminosäuresequenz von CtIP ist zwischen verschiedenen Säugetieren sehr stark konserviert und setzt sich im Menschen aus 897 Aminosäuren zusammen. Neben den verschiedenen Bindungsmotiven für Rb, Brca1 und CtBP konnte im N-Terminus ein Coiled-Coil Motiv zur Dimerisierung zweier CtIP-Moleküle identifiziert werden (Dubin et al. 2004). Das menschliche CtIP-Protein ist in Abb. 1.10. schematisch dargestellt.

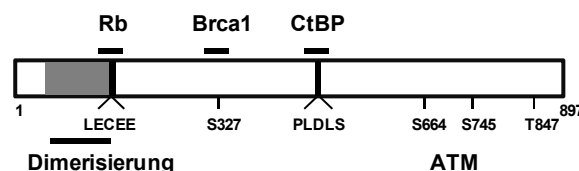


Abb. 1.10. Schematische Darstellung der Proteinstruktur des humanen CtIP

Im N-Terminus befindet sich eine Domäne zur Homodimerisierung (grau). CtIP besitzt Motive, mit denen es an verschiedene Proteine binden kann u.a. an Rb, CtBP und Brca1. Weiterhin sind verschiedene Phosphorylierungsstellen dargestellt (nach Wu und Lee 2006).

In verschiedenen Arbeitsgruppen konnte nachgewiesen werden, dass CtIP nach ionisierender Strahlung in der Zelle in einer hyperphosphorylierten Form vorliegt (Li et al. 2000, Wu-Baer und Baer 2001, Foray et al. 2003). Daraufhin wurden verschiede-

ne Phosphorylierungsstellen innerhalb der Aminosäuresequenz des CtIPs identifiziert. Die Serine 664 und 745 stellen eine Zielsequenz für die Proteinkinase ATM dar (Li et al. 2000). Welche Funktion den beiden Serinen jedoch zukommt, ist im Moment noch nicht geklärt. Eine weitere Phosphorylierungsstelle ist das Serin 327 in der BRCT-Bindungsregion. Es befindet sich in einer Konsensussequenz (Serin/Threonin-Prolin), die bevorzugt von CDKs erkannt wird. Die Phosphorylierung am Serin 327 bewirkt die Interaktion mit dem Tumorsuppressor Brca1. Yu und Chen (2004) konnten zeigen, dass der Brca1/CtIP-Komplex nach der Induktion von DNA-Schäden für den G2/M-Checkpoint essentiell ist, da er eine Funktion bei der Aktivierung von Chk1 besitzt. Erst in den letzten Jahren konnte die genaue Funktion von CtIP bei der Aktivierung der Chk1 aufgeklärt werden. CtIP konnte als funktionales Homolog von Sae2 aus der Hefe identifiziert werden. Wie Sae2 ist CtIP bei der Resektion von DSBs in der HR beteiligt und vermittelt die Ausbildung einzelsträngiger DNA-Bereiche, die zur Aktivierung von ATR führen. ATR phosphoryliert und aktiviert anschließend Chk1 (Sartori et al. 2007, Yuan und Chen 2009, Huertas und Jackson 2009). Die Funktion von CtIP bei der Resektion wird ebenfalls durch eine Phosphorylierung reguliert. Es konnte gezeigt werden, dass das im S/T-P-Motiv befindliche Threonin 847 des CtIPs für die resektionsvermittelte Funktion verantwortlich ist. Weiterhin wiesen diese Studien nach, dass das Threonin 847 durch die CDK1 phosphoryliert wird. (Huertas et al. 2008, Huertas und Jackson 2009).

Für eine effiziente Resektion von DSBs scheint das Protein CtIP mit dem MRN-Komplex zusammenzuarbeiten, denn bereits der Verlust von einem der beiden Faktoren hat ein Ausbleiben der Resektion der DSBs zur Folge (Greenberg et al. 2006, Sartori et al. 2007, Chen et al. 2008). Bisherige Studien besagen, dass durch die direkte Interaktion von CtIP und MRN die Endonukleaseaktivität des Mre11 im MRN-Komplex gefördert und somit die DSB-Resektion initiiert wird (Sartori et al. 2007). Die Aufklärung des genauen Mechanismus der Zusammenarbeit von CtIP und MRN steht allerdings erst am Anfang und bedarf daher noch weiterer Untersuchungen.

1.8. Aufgabenstellung

Das Protein p53, das als „Wächter des Genoms“ bezeichnet wird (Lane 1992), hat eine zentrale Rolle in der Kontrolle des Zellzyklus nach Auftreten von DNA-Schäden. So ist es nicht weiter verwunderlich, dass Mutationen im p53-Gen verheerende Folgen für die Zelle haben können. Die Funktion von p53 am G1/S-Checkpoint ist be-

reits weitestgehend aufgeklärt. So konnte gezeigt werden, dass in Abwesenheit von p53 kein G1/S-Checkpoint initiiert werden kann. Weiterhin ist bekannt, dass bei irreparablen Schäden p53 die Eliminierung der geschädigten Zellen herbeiführt, indem es die Apoptose einleitet. Die Rolle von p53 am zweiten wichtigen Kontrollpunkt des Zellzyklus, dem G2/M-Checkpoint, ist bisher noch relativ unerforscht. Der erste Teil der vorliegenden Arbeit widmet sich daher der Aufklärung der Rolle von p53 am G2/M-Checkpoint. Der Schwerpunkt soll dabei auf den G2/M-Checkpoint von p53-defizienten Zellen nach ionisierender Bestrahlung gerichtet werden. Dazu soll anhand verschiedener biochemischer Methoden untersucht werden, ob p53 einen Einfluss auf die Initiation bzw. die Aufrechterhaltung des G2/M-Checkpoints ausübt. Sollte eine Funktion von p53 am G2/M-Checkpoint charakterisiert werden, soll weiterhin untersucht werden, ob diesem Einfluss ein Defekt in der Reparatur der DNA-Schäden zugrundeliegt. Dazu soll die Reparatur der strahleninduzierten DSBs anhand der γ H2AX- sowie Rad51-Foci-Analyse untersucht werden.

Durch ionisierende Strahlung entstehen in der Zelle DSBs, die in hohem Maße die genomische Integrität der Zelle gefährden. Zur Beseitigung dieser DSBs stehen der Zelle Reparaturmechanismen zur Verfügung. Sowohl in der G1-Phase als auch in der G2-Phase kann die Reparatur in eine schnelle und eine langsame Komponente unterteilt werden (siehe Kapitel 1.3.3.). Die Tatsache, dass die Faktoren Artemis und ATM sowohl in der langsamen Reparatur in G1 als auch in der von G2 vonnöten sind, führt zu den Fragen, bei welchem Reparaturweg diese Faktoren in der G1- und G2-Phase involviert sind und ob es Gemeinsamkeiten zwischen der langsamen Reparatur in G1 und der in G2 gibt. Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit soll sich mit der Charakterisierung der DNA-Reparatur in der langsamen Komponente in der G1- und der G2-Phase beschäftigen. Dazu werden verschiedene Reparaturproteine mittels siRNA-Technik in verschiedenen Zelllinien herunterreguliert. Anschließend wird die Reparatur nach ionisierender Strahlung in diesen Zellen mit der γ H2AX- und der Rad51-Foci-Analyse untersucht. Es sollen zudem neue HR-spezifische Nachweismethoden etabliert werden, wodurch ein besonderes Augenmerk auf die HR gelegt werden kann. Die Ergebnisse sollen dazu beitragen, das komplexe Reparaturverhalten der Zellen besser zu verstehen.

2. Materialien

2.1. Vektoren

Der pEGFP_CtIP-wt_C1-Vektor enthält die cDNA des humanen CtIPs [gi: 42718014], das am N-Terminus mit dem EGFP aus pEGFP-C1 [gi: 1377914] fusioniert. Die verwendete cDNA des humanen CtIP [gi: 42718014] enthält an 3 Stellen stille Mutationen (C133T, A135G, A138G) um eine siRNA-Resistenz zu gewährleisten.

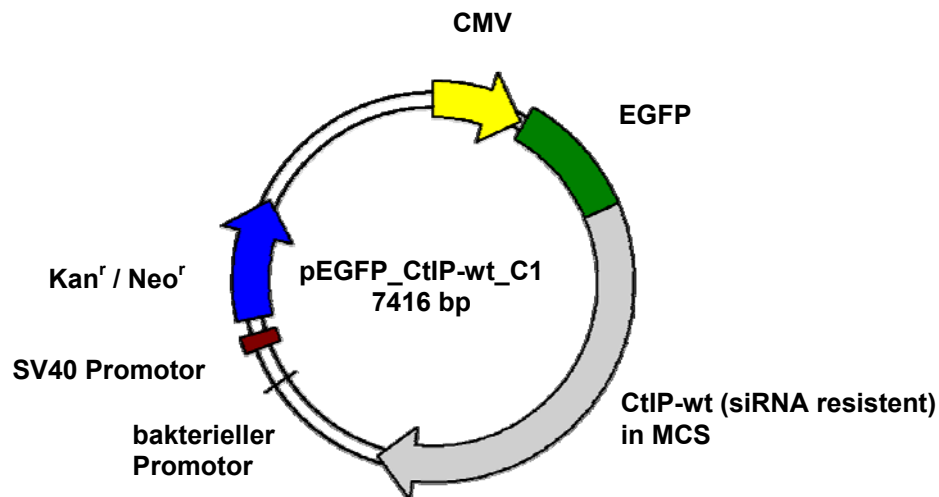


Abb. 2.1. schematische Vektorkarte des Plasmids pEGFP_CtIP-wt_C1.

CMV - eukaryontischer Promotor, MCS - multiple cloning site, Kan^R/Neo^R - Kanamycin/Neomycin-Resistenz

Der pEGFP_CtIP-T847A_C1-Vektor enthält die cDNA des humanen CtIPs (mit siRNA-Resistenz), in der das Threonin an Position 847 durch ein Alanin ausgetauscht wurde. Am N-Terminus ist das CtIP mit dem EGFP aus pEGFP-C1 [gi: 1377914] fusioniert.

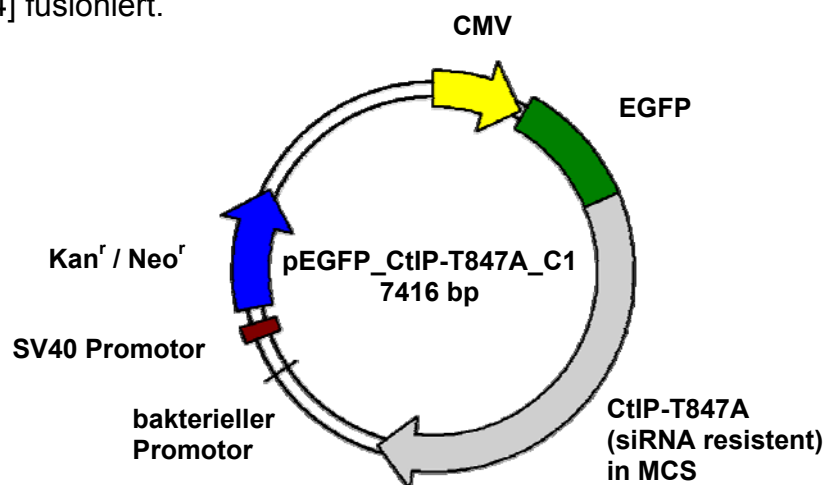


Abb. 2.2. schematische Vektorkarte des Plasmids pEGFP_CtIP-T847A_C1.

CMV - eukaryontischer Promotor, MCS - multiple cloning site, Kan^R/Neo^R - Kanamycin/Neomycin-Resistenz

Die Plasmide wurden uns freundlicherweise von Prof. Dr. S. Takeda (Kyoto, Japan) zur Verfügung gestellt.

2.2. Primer

Die verwendeten Primer wurden bei der Firma Sigma-Aldrich bestellt. Bei den Mutageneseprimern wurde beachtet, dass die zu erfolgende Mutation ungefähr in der Mitte des Primers zu finden ist, und dass die Schmelztemperatur der Primer über 78 °C lag. Außerdem sollte an den Enden des Primers mindestens ein Cytosin oder Guanin vorhanden sein, um eine Verbesserung der Hybridisierung und der Elongation zu ermöglichen. Beim Primerdesign wurde weiterhin darauf geachtet, dass die Primer möglichst keine oder nur geringe Sekundärstrukturen und keine Primerdimere ausbilden. Zur Vorhersage der Sekundärstruktur sowie zur Bestimmung der Schmelztemperatur wurde der DNA-Calculator von SIGMA-Genosys verwendet.

2.2.1. Mutageneseprimer

T847E sense 5' CGCTACATTCCACCCAAC**GA**ACCAGAGAATTTTTGG 3'

- Forward-Mutageneseprimer zur Herstellung einer Phosphomomimikmutante am Threonin 847, Austausch von Thr847 gegen Glu847
- $T_M = 80,28\text{ °C}$
- Sekundärstruktur: keine
- Primerdimerisierung: keine

T847E antisense: 3' CCAAAAATTCTCTGG**TT**CGTTGGGTGGAATGTAGCG 5'

- Reverse-Mutageneseprimer zur Herstellung einer Phosphomomimikmutante am Threonin 847, Austausch von Thr847 gegen Glu847
- $T_M = 80,28\text{ °C}$
- Sekundärstruktur: keine
- Primerdimerisierung: keine

2.2.2. Sequenzierprimer

T847E Seq 5' AAACAAGACAAAGTCAAGCAGAAA 3'

- $T_M = 62,83\text{ °C}$
- Sekundärstruktur: schwach
- Primerdimerisierung: keine

2.3. Enzyme

<i>Pfu</i> -Polymerase	20000 U/ml (Fermentas)
<i>DpnI</i>	2,5 U/μl (Fermentas)
RNase A	10 mg/ml (Sigma-Aldrich)
DNase	1 mg/ml in 50 % Glycerin + 0,15 M NaCl (Roche)
alkalische Phosphatase	1 U/μl (Fermentas)

2.4. siRNA

Die verwendeten siRNAs wurden bei der Firma Qiagen bestellt. Beim Design der siRNAs wurde beachtet, dass die Sequenz der humanen Gensequenz entspricht, da mit humanen Zelllinien gearbeitet wurde. Weiterhin sollten die siRNAs aus weniger als 30 Nukleotiden bestehen und einen GC-Gehalt von 50 % nicht überschreiten.

Tab. 2.1. siRNAs und ihre Sequenzen

siRNA	Sequenz	Stammlösung
Artemis	5' AACTGAAGAGAGCTAGAACAG 3'	20 μM
ATM	5' CACCTGTTTGTAGTTTATTA 3'	20 μM
Brca2	5' TTGGAGGAATATCGTAGGTAA 3'	20 μM
CtiP	5' TCCACAACATAATCCTAATTT 3'	50 μM
CtiP (2)	5' AAGCTAAAACAGGAACGAATC 3'	50 μM
Kap1	5' CAGTGCTGCTAGCTGTGAGGATA 3'	20 μM
Ku80	5' AAGACAGACACCCTTGAAGAC 3'	20 μM
Lig4	5' CAAGATGTTTACAGAAAGGAA 3'	20 μM
Negativ- Kontrolle (K)	5' AATTCTCCGAACGTGTCACGT 3'	20 μM
p53	5' TTGGTCGACCTTAGTACCTAA	20 μM
Rad51	5' AAGGGAATTAGTGAAGCCAAA	20 μM

2.5. Inhibitoren

Aphidicolin	1 mg/ml in DMSO (Calbiochem)
Nocodazol	500 μg/ml DMSO (Sigma-Aldrich)

SB218078 1 mM in DMSO (Calbiochem)

Roscovitin 15 mM in DMSO (Sigma-Aldrich)

2.6. Antikörper

2.6.1. Primärantikörper

Rabbit Anti-Artemis (NB 100-542)
(polyklonal IgG) Novus Biologicals

Mouse Anti-ATM (ATM 11G12)
(monoklonal IgG) Abcam

Rabbit Anti-Brc2 (#9012)
(polyklonal IgG) Cell Signaling Technology

FITC Mouse Anti-BrdU (3D4)
(monoklonal IgG) BD Pharmingen

Mouse Anti-BrdU
(monoklonal IgG) Roche

Rabbit Anti-cdc25C-NT Antikörper gegen die Peptidsequenz aus den Aminosäuren 134-210 am N-terminus von cdc25C (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. M. Montenarh, Universität des Saarlandes, Homburg (Saar))

Rabbit Anti-phospho-cdc25C (Ser198)
(#9529) (polyklonal IgG) Cell Signaling Technology

Rabbit Anti-phospho-cdc25C (Ser 216)
(63F9) (monoklonal IgG) Cell Signaling Technology

Rabbit Anti-CENP-F (C19) (polyklonal IgG)	Santa Cruz Biotechnology
Mouse Anti-CtIP (E-2) (monoklonal IgG)	Santa Cruz Biotechnology
Rabbit Anti-DNA-Ligase IV (SP1275) (polyklonal IgG)	Acris Antibodies
Rabbit Anti-GAPDH (polyklonal IgG)	Santa Cruz Biotechnology
Mouse Anti-GFP (monoklonal IgG)	Roche
Mouse Anti-phospho-H2AX (Ser139) (#05-636) (monoklonal IgG)	Millipore
Rabbit Anti-phospho-Histone3 (Ser10) (#06-570) (polyklonal IgG)	Millipore
Mouse Anti-Kap1 (20C1) (monoklonal IgG)	Abcam
Rabbit Anti-Ku80 (C48E7) (monoklonal IgG)	Cell Signaling Technology
Mouse Anti-p53 (Do1) (monoklonal IgG)	Santa Cruz Biotechnology
Rabbit Anti-Plk1 (208G4) (monoklonal IgG)	Cell Signaling Technology

Rabbit Anti-Rad51 (PC130) (polyklonal IgG)	Calbiochem
---	------------

Rabbit Anti-Rad51 (ab63801) (polyklonal IgG)	Abcam
---	-------

Mouse Anti-Tubulin (sc-8035) (monoklonal IgG)	Santa Cruz Biotechnology
--	--------------------------

2.6.2. Sekundärantikörper

Goat Anti-Mouse IgG-HRP (sc-2030)	Santa Cruz Biotechnology
-----------------------------------	--------------------------

Goat Anti-Rabbit IgG-HRP (sc-2031)	Santa Cruz Biotechnology
------------------------------------	--------------------------

Goat Anti-Mouse IgG-AlexaFluor488	MolecularProbes
-----------------------------------	-----------------

Goat Anti-Mouse IgG-AlexaFluor594	MolecularProbes
-----------------------------------	-----------------

Goat Anti-Rabbit IgG-AlexaFluor488	MolecularProbes
------------------------------------	-----------------

Goat Anti-Rabbit IgG-AlexaFluor594	MolecularProbes
------------------------------------	-----------------

2.7. Längenstandards

Gene Ruler™ 1kb DNA Ladder	Fermentas
----------------------------	-----------

PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder #SM1811	Fermentas
--	-----------

Prestained Protein Molecular Weight Marker #SM0441	Fermentas
---	-----------

HiMark™ Prestained HMW Protein Standard	Invitrogen
---	------------

2.8. kommerziell erhältliche Kits

QIAprep® Spin Miniprep Kit (50)	Qiagen
---------------------------------	--------

Nucleobond® Maxi Prep	Macherey Nagel
-----------------------	----------------

2.9. Transfektionsreagenzien

Effectene Transfection Reagent	Qiagen
HiPerFect Transfection Reagent	Qiagen
Amaya [®] Cell Line Nucleofector [®] Kit V	Lonza

2.10. Chemikalien

Agar	Roth
APS	Roth
Borsäure	Roth
Bromphenolblau	Merck
BrdU	BD Pharmingen
BSA	AppliChem
CaCl ₂	Roth
DAPI	Sigma-Aldrich
DMSO	Sigma-Aldrich
DTT	Roth
EDTA	Roth
FDP	
Formaldehyd	Roth
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
Hefeextrakt	Roth
Kaliumacetat	Sigma-Aldrich
KCl	Roth
KH ₂ PO ₄	Roth
Magermilchpulver	Fremma
MES	Roth
MgCl ₂	Roth
MgSO ₄	Roth
MnCl ₂	Roth
MOPS	Sigma-Aldrich
Na ₂ HPO ₄	Roth

NaCl	Roth
Natriumdesoxycholat	Roth
NP40	Roth
Pepton	Roth
PhosStop	Roche
Proteaseinhibitor Complete	Roche
Propidiumiodid	Roth
RbCl	Sigma-Aldrich
Rotiphere®Gel 30	Roth
SDS	Roth
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
TEMED	Roth
Tris	Roth
TritonX-100	Roth
Trypton	Roth
Tween20	Roth

2.11. Bakterienstämme und Zelllinien

2.11.1. Bakterienstämme

E. coli DH5α

2.11.2. Zelllinien

HCT116p53wt	humane Epithelzellen aus einem Kolonkarzinom, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. M. Montenarh (Universität des Saarlandes, Homburg (Saar), Deutschland), Kultivierung in McCoy's Medium mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS)
HCT116p53-/-	humane Epithelzellen aus einem Kolonkarzinom, in der beide p53 Allele ausgeschaltet wurden, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. M. Montenarh (Universität des Saarlandes, Homburg (Saar), Deutschland), Kultivierung in McCoy's Medium mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS)

HeLa-S3	stammen aus einem Cervix-Adenokarzinom und weisen eine epitheliale Morphologie auf, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. M. Montenarh (Universität des Saarlandes, Homburg (Saar), Deutschland), Kultivierung in Dulbecco's <i>Minimal Essential Medium</i> (DMEM) mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) und 1 % nicht essentieller Aminosäuren (NEAA)
82-6 hTert	primäre humane Hautfibroblasten, Immortalisierung durch Transformation eines hTert-exprimierenden (<i>human Telomerase reverse transcriptase</i>) Retrovirus, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. P. A. Jeggo (University of Sussex, Brighton, UK), Kultivierung in <i>Minimal Essential Medium</i> (MEM) mit 20 % fötalem Kälberserum (FCS) und 1 % nicht essentieller Aminosäuren (NEAA)
CJ hTert	primäre humane Hautfibroblasten eines Patienten mit einem Defekt im <i>Artemis</i> -Gen, Immortalisierung durch Transformation eines hTert-exprimierenden (<i>human Telomerase reverse transcriptase</i>) Retrovirus, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. P. A. Jeggo (University of Sussex, Brighton, UK), Kultivierung in <i>Minimal Essential Medium</i> (MEM) mit 20 % fötalem Kälberserum (FCS) und 1 % nicht essentieller Aminosäuren (NEAA)

2.12. Lösungen, Puffer und Medien

Die Lösungen wurden gegebenenfalls mit NaOH (1 M) oder HCl (37 %ig oder 1 M) auf den entsprechenden pH-Wert eingestellt.

2.12.1. für molekularbiologische Methoden

Mutagenese

dNTP-Mix (10 mM):	10 mM dATP
	10 mM dCTP
	10 mM dGTP
	10 mM dTTP

10 x *Pfu* Reaction Buffer (Fermentas)

Agarosegelelektrophorese

Ladepuffer: 6 x Loading Dye Solution (Fermentas)

1 x TBE-Puffer: 44,5 mM Tris pH 8,0
44,5 mM Borsäure
1 mM Na₂EDTA
ad. Aqua dest.

Bakterienkultur

LB-Medium: 10 g/l Pepton
5 g/l Hefeextrakt
5 g/l NaCl

LB-Agar: 1,5 % (w/v) Agar in LB-Medium

SOB-Medium: 2 % (w/v) Trypton
0,5 % (w/v) Hefeextrakt
10 mM NaCl
2,5 mM KCl
10 mM MgCl₂
10 mM MgSO₄

Lösung 1: 30 mM Kaliumacetat pH 5,8
50 mM MnCl₂
100 mM RbCl
10 mM CaCl₂
15 % (w/v) Glycerin
ad. Aqua dest.

Lösung 2:	10 mM RbCl	pH 6,8
	75 mM CaCl ₂	
	10 mM MOPS	
	15 % (w/v) Glycerin	
	ad. Aqua dest.	

2.12.2. für zellbiologische Methoden

Standardpuffer

PBS:	137 mM NaCl	pH 7,4
	2,7 mM KCl	
	8 mM Na ₂ HPO ₄	
	1,5 mM KH ₂ PO ₄	

TBS	20 mM Tris	pH 7,6
	137 mM NaCl	

Zellkultur

Trypsin/ EDTA:	0,5 M EDTA	pH 8
	2,5 % (v/v) Trypsin	
	ad. PBS	

Zellaufschluss

Zelllysepuffer:	50 mM Tris/HCl	pH 8
(Ripa-Puffer)	150 mM NaCl	
	0,5 % Natriumdesoxycholat	
	1 % TritonX-100	
	0,1 % SDS	

SDS-Gel

Elektrophoresepuffer:	25 mM Tris/ HCl	pH 8,8
	0,2 M Glycin	
	0,5 % (w/v) SDS	

2x SDS-Probenpuffer:	120 mM Tris/ HCl	pH 6,8
	4 % (w/v) SDS	
	10 mM bzw. 10 % β -Mercaptoethanol	
	20 % (v/v) Glycerin	
	0,02 % Bromphenolblau	

Western Blot

Transferpuffer:	20 mM Tris/HCl	pH 8,3
	150 mM Glycin	

Transferpuffer (große Proteine)	20 mM Tris/HCl	pH 8,3
	150 mM Glycin	
	0,05 % SDS	

Blockierlösung:	5 % Magermilch
	0,1 % Tween20
	PBS

Primärantikörperlösung:	1 % Magermilch		5 % BSA
	0,1 % Tween20	oder	0,1 % Tween20
	PBS		TBS

Sekundärantikörperlösung:	1 % Magermilch
	0,1 % Tween20
	PBS

Waschpuffer	0,1 % Tween20
	PBS oder TBS

Immunpräzipitation

Blocklösung:	10 % BSA in PBS
--------------	-----------------

FDP-Assay

FDP-Puffer: 50 mM Tris/ HCl pH 8
1 mM DTT

FDP-Lösung 20 µM FDP in FDP-Puffer

FACS-Analyse

Permeabilitätslösung: 0,25 % TritonX-100 in PBS

Blockierlösung: 1 % BSA in PBS

PI-Lösung: 0,05 mg / ml Propidiumiodid
0,5 mg / ml RNase A
ad. PBS

Immunfluoreszenz

Fixierlösung: 2,5 % Formaldehyd in PBS

Permeabilitätslösung: 0,25 % TritonX-100 / 1 % FCS in PBS

Blockierlösung: 5 % BSA
1 % FCS
PBS

Waschlösung : 1 % FCS in PBS

DAPI-Lösung: 0,2 µg DAPI/ml PBS

2.13. Verbrauchsmaterialien

Deckgläser, 15x15mm	Roth
Filterpapier, Whatman	Schleicher&Schüll
Küvetten (Kunststoff)	Roth
Latexhandschuhe Ansell Derma Clean	VWR
Nitrilhandschuhe Neoprotect	Neolab

Objektträger superfrost		Roth
Parafilm		Roth
Pasteurpipetten, Glas		Roth
Pasteurpipetten, Kunststoff		Roth
Pipettenspitzen		Sarstedt
Pipettenspitzen, gestopft		Roth
PVDF-Membran		GE Healthcare
Reaktionsgefäße SafeSeal 0,5 ml; 1,5ml; 2ml		Roth
Rundbodenröhrchen für FACS		BD Bioscience
Sterilfilter (Rotilabo 0,22 µm)		Roth
Transfektionsküvetten		Amixa
Wischtücher KimWipes		Neolab
Zellkulturflaschen 25 cm ²		Biochrom
Zellkulturflaschen 75 cm ²		Biochrom
Zellkulturschalen 100x20 mm		Biochrom
Zellkulturschalen Nunclon 35x10 mm		VWR
Zellkulturschalen Nunclon 60x15 mm		VWR
Zentrifugenröhrchen 15 ml		Sarstedt
Zentrifugenröhrchen 50 ml		Neolab

2.14. Geräte

Agarosegel-Elektrophorese-		Gibco
Ausstattung		
Chemilumineszenz-	ChemiSmart 5000	Vilber Lourmat
Detektionsgerät		
Durchflusszytometer	FACScan™	Becton Dickinson
Fluoreszenzmikroskope mit	Axioplan2	Zeiss
Kamerasystem	Axioskop	
Folienschweißgerät	Folio	Severin
Inkubatoren	Hera cell 240	ThermoScientific
	Heraeus	
Inversmikroskop (Zellkultur)	Eclipse TS100	Nikon
Kühl- und Gefrierschränke		Liebherr
Kühltruhe -70°C	Herafreeze	Thermo scientific

Magnetrührer	Varimag® MRHei-Standard	H+P Labortechnik Heidolph
Mikroliterpipetten		Gilson
Mikrowellengerät		Exquisit
pH-Meter	pMX2000	WTW
Pipettierhilfe Pipetboy		Integra
Polyacrylamidgel-Elektrophorese-Ausstattung	SE260 Mighty Small	Hoefer
Power Supply		Pharmacia biotech
Röntgenröhre	MCN 165/796704	Philips
Spektralphotometer	Ultrospec 3000pro	Amersham
Sterilwerkbänke	Herasafe	Thermo scientific
Stickstofftank	Locator 8+	Thermolyne
Taumler	3011	GFL
Thermocycler	Tpersonal	Biometra
Thermomixer	comfort	Eppendorf
Tischschwenkplatte		Fröbel
Tischzentrifuge		neolab
Transfektionssystem		Amaxa
Ultraschallgerät	Sonorex	Bandelin
Vortex	genie2	Scientific industries
Waagen	TE1502S TE153S-DS	Satorius
Wasserbad		Memmert
Western Blot-Apparatur		Hoefer
Zählkammer	Neubauer Zählkammer	Marienfeld
Zentrifugen	Centrifuge 5804R Centrifuge 5810R Centrifuge 5415R	Eppendorf

2.15. Software und Onlineprogramme

Primerdesign	http://www.sigma-genosys.com/calc/DNACalc.asp
Auswertung der DNA-Sequenzierung	CLC Sequence Viewer 5
Erstellung von Vektorkarten	pDraw32
Dokumentation von Gelen	ChemiCapt (Vilber Lourmat)
Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen	AxioVision 4.6. (Zeiss)
	Metafer (Metasystems)
	Isis (Metasystems)

3. Methoden

3.1. molekularbiologische Methoden

3.1.1. Herstellung kompetenter Zellen (RbCl-Methode)

Die Herstellung kompetenter *E.coli* DH5 α -Zellen erfolgte mittels Rubidiumchlorid. Es wurde eine Vorkultur mit einem Aliquot (100 μ l) RbCl-kompetenten DH5 α -Zellen in 5 ml SOB-Medium angesetzt und über Nacht bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde mit 1 ml der Vorkultur eine 100 ml Hauptkultur angeimpft und bei 37 °C und 220 rpm inkubiert bis eine OD₅₅₀ von 0,5 erreicht wurde. Dann wurde die Hauptkultur in eiskalten 50 ml Reaktionsgefäßen 10 min bei 2800 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellsediment in 12,5 ml Lösung I resuspendiert und erneut 10 min bei 2800 x g und 4 °C zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Zellsediment in 8 ml eiskalter Lösung II resuspendiert. Die Zellsuspension wurde à 100 μ l aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die kompetenten Zellen wurden bis zur Verwendung bei –80 °C aufbewahrt.

3.1.2. Transformation von *E.coli* DH5 α

Für die Transformation wurde pro Plasmid ein Aliquot kompetenter *E.coli* DH5 α -Zellen langsam auf Eis aufgetaut. Zu den aufgetauten Zellen wurden 5 μ l des Mutageneseansatzes (3.1.7.) bzw. 100 ng Plasmid-DNA zugefügt und 30 min auf Eis inkubiert. Zur Aufnahme des Plasmides wurden die Zellen 90 s bei 42 °C erhitzt und dann 2 min auf Eis gekühlt. Die Transformationsansätze wurden mit 900 μ l LB-Medium versetzt und 60 min bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Danach wurden die Ansätze 1 min bei 10.000 x g zentrifugiert und 600 μ l des Überstandes abgenommen und verworfen. Das Zellsediment wurde im restlichen Überstand resuspendiert und auf LB-Agarplatten (10 μ g/ml Kanamycin enthaltend) mit einem Glasspatel ausplattiert. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C konnten die Kolonien von der Platte gepickt und für weitere Versuche verwendet werden. Als Positivkontrolle wurde das jeweilige Ausgangsplasmid und als Negativkontrolle nicht transformierte kompetente Zellen mitgeführt.

3.1.3. Animpfen einer Vor- bzw. Hauptkultur

Zum Ansetzen einer Vorkultur wurden 5 ml LB-Medium, 10 µg/ml Kanamycin enthaltend, mit 1 µl Glyzerinstockkultur bzw. einer gepickten Kolonie angeimpft und ca. 16 h bei 37 °C und 220 rpm inkubiert.

Beim Animpfen der Hauptkultur wurden 100 ml LB-Medium, 10 µg/ml Kanamycin enthaltend, mit 100 µl der Vorkultur angeimpft und ca. 24 h bei 37 °C und 220 rpm inkubiert.

3.1.4. Anlegen eines Glyzerinstocks

Zur Lagerung der transformierten-kompetenten Zellen wurden 850 µl Vorkultur mit 150 µl Glyzerin gemischt und bei –80 °C gelagert. Um die Zellen wieder in Kultur zu bringen, wurde wie unter 3.1.3. beschrieben eine Vorkultur angelegt.

3.1.5. Plasmidpräparation

3.1.5.1. Minipräparation

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA wurden transformierte *E.coli*-Zellen einer Plasmidpräparation unterzogen. Die Präparation erfolgte mittels des kommerziell erhältlichen Minipräparationskits „QIAprep® Minipreps“ von Qiagen.

Für die Präparation wurde die am Tag zuvor angeimpfte Vorkultur (3.1.3.) geerntet. Die nachfolgenden Präparationsschritte erfolgten alle bei RT. Dazu wurde die Vorkultur nacheinander in einem 2 ml Reaktionsgefäß jeweils 5 min und 10.000 x g zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Zellsediment in 250 µl Zellsuspensionslösung resuspendiert. Zur Zelllyse wurde die Zellsuspension mit 250 µl Zelllyselösung versetzt, durch Invertieren gemischt und 5 min inkubiert. Danach wurden 350 µl Neutralisationspuffer hinzugefügt, invertiert und 10 min bei 14.000 x g zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde ohne Zellbestandteile auf die im Kit enthaltene Miniprep-Säule überführt und 1 min bei 16.000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, die Säule mit 500 µl Waschlösung gewaschen und erneut nach obigen Angaben zentrifugiert. Der Waschschrift wurde mit 750 µl Waschlösung wiederholt. Zur vollständigen Entfernung der Waschlösung wurde die Säule 2 min bei 14.000 x g zentrifugiert. Die trockene Säule wurde in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und zur Elution der Plasmid-DNA mit 50 µl nukleasefreiem H₂O versetzt. Nach einminütiger Inku-

bation wurde die DNA durch Zentrifugation bei 14.000 x g 1 min eluiert. Die Bestimmung des DNA-Gehaltes (siehe 3.1.6.) erfolgte spektroskopisch. Die Plasmidpräparation wurde bei – 20 °C aufbewahrt.

3.1.5.2. Maxipräparation

Um große Mengen des Plasmides für die Transfektion eukaryotischer Zellen zu erhalten, wurde die Präparation mit dem „NucleoBond® Plasmid Purification System–Kit“ von Macherey-Nagel durchgeführt.

Für die Präparation wurde zunächst wie unter 3.1.3. beschrieben eine Vorkultur und dann eine Hauptkultur angesetzt. Die Zellen der Hauptkultur wurden in einem 50 ml Reaktionsgefäßen durch 15minütige Zentrifugation bei 4 °C und 6.000 x g geerntet. Das erhaltene Zellsediment wurde in 12 ml Resuspensionspuffer mit RNase aufgenommen. Die Zellyse erfolgte durch Zugabe von 12 ml Lysepuffer und anschließender fünfminütiger Inkubation bei RT. Nach Zugabe von 12 ml Neutralisationspuffer wurde 5 min auf Eis inkubiert. Das Zellysat wurde zur Klärung durch einen NucleoBond® Folded Filter gefiltert. Inzwischen wurde eine im Kit enthaltene Maxiprep–Säule mit 6 ml Äquilibrationpuffer äquilibriert. Der klare Überstand wurde auf die äquilibrierte Säule gegeben und der Durchfluss verworfen. Danach wurde die Säule mit 32 ml Waschpuffer gewaschen. Zur Elution der Plasmid-DNA wurden 15 ml Elutionspuffer auf die Säule gegeben und der Durchfluss in einem 50 ml Reaktionsgefäß aufgefangen. Die DNA-Fällung erfolgte durch Zugabe von 11 ml eiskaltem Isopropanol. Nach Mischen des Ansatzes wurde bei 10.500 x g und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Das erhaltene DNA-Pellet wurde vorsichtig mit eiskaltem 70 %igen Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (10 min, 4 °C und 15.000 x g). Das Pellet wurde an der Luft getrocknet und mit 100 µl nukleasefreiem H₂O versetzt. Um die DNA möglichst vollständig wieder zu lösen, wurde das Pellet über Nacht bei 4 °C mit dem nukleasefreiem H₂O inkubiert. Die Bestimmung des DNA-Gehaltes (siehe 3.1.6.) erfolgte spektroskopisch. Anschließend wurde die DNA-Konzentration mit nukleasefreiem H₂O auf 1 µg/µl eingestellt.

3.1.6. Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte photometrisch, dazu wurde die Extinktion einer 1:50 verdünnten DNA-Lösung aus der Minipräparation (3.1.5.1.) bzw. 1:100 verdünnten Maxipräparation (3.1.5.2.) bei 260 nm in einer Quarzküvette bestimmt und nach folgender Formel der DNA-Gehalt berechnet:

$$c_{DNA} (\mu\text{g} / \mu\text{l}) = 50 * E_{260} * \text{Verdünnungsfaktor}$$

Zur Bestimmung der Reinheit des Plasmids wurde außerdem die Extinktion der Probe bei 280 nm bestimmt und der Quotient aus E_{260}/E_{280} gebildet. Eine nahezu proteinfreie Probe weist einen Quotient zwischen 1,8 und 2,2 auf.

3.1.7. Mutagenese - PCR

Um die gewünschten Mutanten zu erzeugen, wurde die QuickChange™ Site-Directed-Mutagenese durchgeführt.

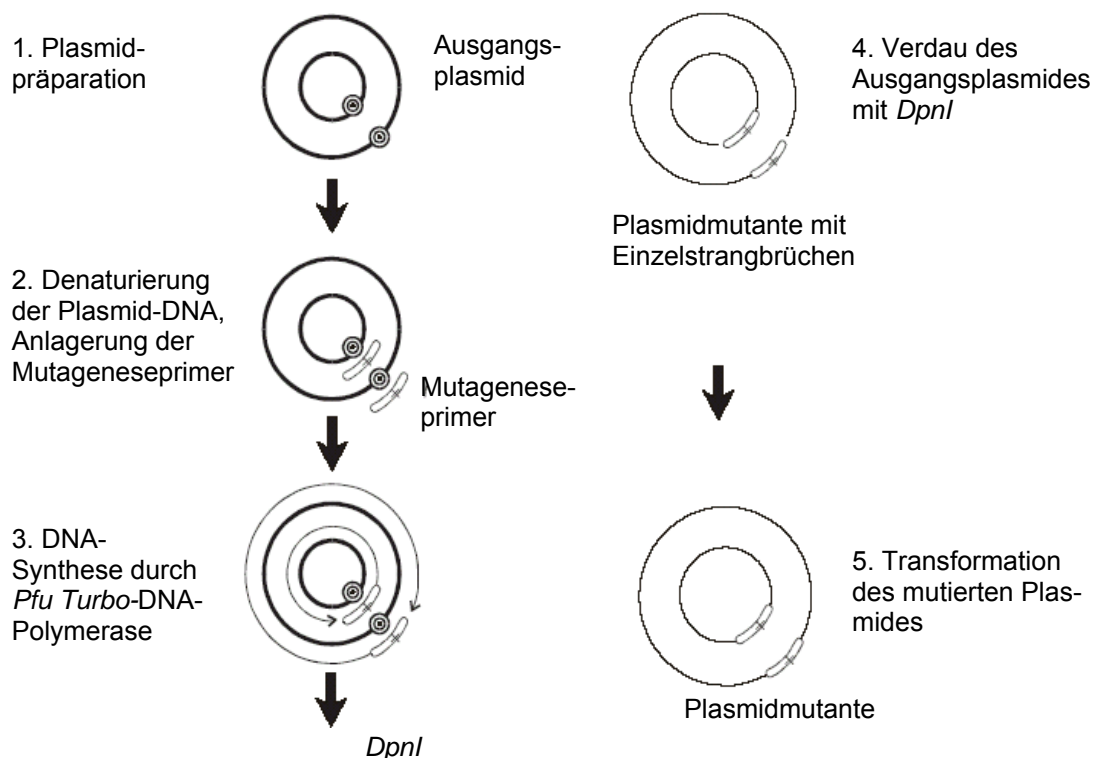


Abb. 3.1. schematische Darstellung der QuickChange™ Site-Directed Mutagenesemethode

Für die Mutagenese wurden zwei zueinander komplementäre Mutageneseprimer mit einer Länge von ca. 30 bp verwendet, die etwa in der Mitte der Sequenz die gewünschte Veränderung tragen. Mit diesen Primern, dem Ausgangsplasmid und der *Pfu-Turbo*-DNA-Polymerase wurde die jeweilige Mutagenese-PCR mit der in

Tab. 3.1. aufgeführten Zusammensetzung durchgeführt. Zur Verringerung der Sekundärstruktur und zur Erleichterung der Strangtrennung wurde dem Ansatz 5 % DMSO hinzugefügt.

Tab. 3.1. Zusammensetzung eines Mutagenese-PCR-Ansatzes

Komponenten	Menge im Ansatz
10 x <i>Pfu</i> -Reaktionspuffer	1 x
Ausgangsplasmid (10 ng/μl)	10 ng
Sense Mutageneseprimer (125 ng/μl)	125 ng
Antisense Mutageneseprimer (125 ng/μl)	125 ng
dNTP-Mix	10 mM
DMSO	5 %
Nuklease freies H ₂ O	ad. 50 μl
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	1 μl

Als Negativkontrolle wurde ein Mutageneseansatz ohne Ausgangsplasmid mitgeführt. Die Mutagenese-PCR erfolgte nach dem in Tab. 3.2. angegebenen Programm.

Tab 3.2. Mutagenese-PCR-Programm

Schritt	Zyklen	Temperatur	Zeit
1 einleitende Denaturierung	1	95 °C	5 min
2 Denaturierung	18	95 °C	1 min
Annealing der Primer		60 °C	1 min
Elongation		68 °C	17 min*
3 abschließende Elongation	1	68 °C	10 min
4		4 °C	∞

*abhängig von der Größe des Vektors, bei pEGFP_CtIP-wt_C1 17 min

3.1.8. *DpnI*-Verdau

Zur Entfernung des Ausgangsplasmids wurde dem Mutageneseansatz 10 U *DpnI* zugesetzt und 2 h bei 37°C inkubiert. Das Restriktionsenzym *DpnI* schneidet methyliertes *E.coli* Ausgangsplasmid an einer Erkennungssequenz von 4 Nukleotiden in viele kleine DNA-Fragmente, während *in vitro* synthetisierte DNA nicht methyliert ist und somit nicht geschnitten wird.

3.1.9. Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese ist es möglich, unter anderem DNA-Plasmide und DNA-Fragmente aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe und somit eines unterschiedlichen Wanderungsverhaltens im Gel zu trennen. Die Methode diente der Überprüfung der Mutagenese-PCR. Zunächst wurde ein 1 %iges Agarosegel gegossen.

Agarosegel: 0,5 g Agarose
 50 ml 1 x TBE Puffer

10 µl des Mutageneseansatzes nach *DpnI*-Verdau wurden mit 2 µl 6x Ladepuffer versetzt und aufgetragen. Als Positivkontrolle wurden 100 ng des Ausgangs-plasmides (in 10 µl H₂O) mit 2 µl 6x Ladepuffer mitgeführt. Weiterhin wurde ein DNA-Standard mitgeführt, um den Fragmenten ihre entsprechende Größe zuzuordnen zu können. Die Elektrophorese erfolgte 60 min bei 90 V. Nach anschließender Färbung des Geles im Ethidiumbromidbad (0,5 µg/ml) erfolgte die analytische Auswertung unter kurzweiliger UV-Bestrahlung mit Hilfe des „ChemiSmart 5000“.

3.1.10. Sequenzierung

Die Sequenzierung diente der Überprüfung der Sequenz, der bei der Mutagenese erhaltenen Plasmide. Diese Plasmide (mind. 300 ng) sowie die Primer wurden zur Sequenzierung an Qiagen geschickt.

Die identifizierten Sequenzen wurden mit Hilfe des Programmes „BioEdit“ betrachtet und anschließend durch Benutzung von „CLC Sequence Viewer 5“ mit den Zielsequenzen verglichen.

3.2. zellbiologische Methoden

3.2.1. Auftauen von humanen Zelllinien

Die im Stickstofftank eingefrorenen Zellen wurden 1 min bei 37 °C aufgetaut. Nach Resuspension der Zellen in 5 ml Zellmedium wurde 7 min bei 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und das Zellsediment in 10 ml Zellmedium resuspendiert, in eine kleine Kulturflasche (25 cm²) überführt und wie unter 3.2.2. beschrieben kultiviert.

3.2.2. Kultivierung von humanen Zelllinien

3.2.2.1. Passagieren von humanen Zelllinien

Das Passagieren der humanen Zelllinien erfolgte bei einer Konfluenz von ca. 90%, um ein optimales Wachstum zu ermöglichen. Zunächst wurde das alte Kulturmedium abgenommen und die Zellen mit 5 ml sterilem PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen zum Ablösen 3 min mit 0,5 ml Trypsin/EDTA inkubiert. Die Trypsinierung wurde durch Zugabe von Kulturmedium gestoppt. Die Zellen wurden vereinzelt und je nach Zelllinie 1:4 – 1:10 passagiert. Die passagierten Zellen waren nach 4-5 Tagen erneut zu 90 % konfluent.

3.2.2.2. Zellzahlbestimmung

Zur Zellzahlbestimmung wurden die Zellen wie unter 3.2.2.1. beschrieben vom Boden gelöst und gut vereinzelt. 10 µl der Zellsuspension wurden auf die Neubauer-Zählkammer gegeben und unter dem Lichtmikroskop ausgewertet. Für die Bestimmung der Zellzahl wurden jeweils 4 Großquadrate mit jeweils 16 Kleinquadraten ausgezählt und der Mittelwert pro Großquadrat gebildet. Die Anzahl der Zellen pro ml errechnet sich nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{Mittelwert pro Großquadrat}}{\text{Fläche} * \text{Tiefe}} * 1000$$

Für ein Großquadrat ergeben sich folgende Größen:

Fläche = 1 mm²

Tiefe = 0,1 mm

3.2.2.3. Aussäen der humanen Zelllinien in kleine und mittlere Zellkulturschalen sowie in kleine Kulturflaschen (25 cm²)

Für die nachfolgenden Versuche wurden die verschiedenen Zelllinien je nach Art des Experimentes und Bedarf der Zellzahl in kleine (8,8 cm²), mittlere (21,5 cm²) und große (60,1 cm²) Zellkulturschalen sowie kleine Zellkulturflaschen (25 cm²) in einem definierten Volumen Zellkulturmedium ausgesät (Tab. 3.3.).

Tab. 3.3. definierte Zellzahl verschiedener humaner Zelllinien zum Aussäen in kleine (8,8 cm²), mittlere (21,5 cm²) und große (60,1 cm²) Zellkulturschalen sowie kleine Zellkulturflaschen (25 cm²)

Zelllinie	8,8 cm ²	21,5 cm ²	60,1 cm ²	25 cm ²
	Zellkulturschale	Zellkulturschale	Zellkulturschale	Zellkulturflasche
HCT116	3-5 x 10 ⁵	7-10 x 10 ⁵	3,4 x 10 ⁶	1,4 x 10 ⁶
p53wt / p53-/-	in 2,2 ml	in 5,5 ml	in 10 ml	in 6,5 ml
HeLa S3	3-5 x 10 ⁵	7-10 x 10 ⁵	3,4 x 10 ⁶	1,4 x 10 ⁶
	in 2,2 ml	in 5,5 ml	in 10 ml	in 6,5 ml
82-6 hTert	4 x 10 ⁴	1 x 10 ⁵	-	-
	in 2,2 ml	in 5,5 ml		
CJ hTert	4 x 10 ⁴	1 x 10 ⁵	-	-
	in 2,2 ml	in 5,5 ml		

Im Gegensatz zu durchflusszytometrischen und proteinanalytischen Methoden, muss bei Versuchen mit anschließender Immunfluoreszenzfärbung darauf geachtet werden, dass vor dem Aussäen der Zellen sterile Deckgläschen in die Zellkulturschalen überführt wurden. Abhängig vom weiteren Verlauf des Versuches wurden die Zellen sofort 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂ bis zur weiteren Behandlung inkubiert oder vor der weiteren Inkubation zunächst mit siRNA bzw. Plasmiden transfiziert.

3.2.3. Transiente Transfektion humaner Zelllinien

3.2.3.1. Transfektion von siRNA mit dem „HiPerfect Transfection Reagent“

Das Einbringen von siRNA in die Zelle erfolgte mit dem „HiPerfect Transfection Reagent“ von der Firma Qiagen. Die Zellen wurden zunächst, wie unter 3.2.2.3. beschrieben, ausgesät und bis zur Transfektion bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Abhängig von der Art der siRNA wurde eine definierte Menge in einem definierten

Volumen Zellkulturmedium ohne Zusätze gelöst (Tab. 3.4.). „HiPerfect Transfection Reagent“ wurde zu der gelösten siRNA gegeben und ca. 1 min gevortext. Nach zehnminütiger Inkubation bei RT zur Ausbildung von Transfektionskomplexen wurde die siRNA-HiPerFect-Lösung langsam und unter Schwenken zu den Zellen getropft. Bis zur weiteren Behandlung (48 - 72 h) wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Tab. 3.4. Einzusetzende Menge an Zellkulturmedium ohne Zusätze, siRNA und HiPerfect für die siRNA-Transfektion von humanen Zelllinien

	Zellzahl	Medium	siRNA	Medium ohne alles	HiPerFect
kleine Schale (8,8 cm²)	0,4 - 5 * 10 ⁵	2,2 ml	1,2 -3 µl	ad. 100 µl	12 µl
mittlere Schale (21,5 cm²)	1-10 * 10 ⁵	5,5 ml	2,88 – 7,2 µl	ad. 240 µl	28,8 µl
kleine Flasche (25 cm²)	14,2 * 10 ⁵	6,5 ml	3,4 – 8,5 µl	ad. 282,8 µl	34 µl

Je nach Art der siRNA mussten unterschiedliche Endkonzentrationen eingesetzt und auch unterschiedlich lange inkubiert werden (Tab. 3.5.)

Tab. 3.5. Einzusetzende Menge und Inkubationszeit von verschiedenen siRNA

siRNA	Inkubationszeit	Endkonzentration
Artemis	48 h	15 nM
ATM	48 h	10 nM
Brca2	48 h	25 nM
CtIP	48 h	50 nM
CtIP (2)	48 h	50 nM
Kap1	48 h	20 nM
Ku80	72 h	15 nM
Lig4	48 h	10 nM
Negativkontrolle (K)	48 h – 72 h	10 - 50 nM
p53	48 h	15 nM
Rad51	48 h	10 nM

3.2.3.2. Transfektion von Plasmid-DNA mit „Effectene Transfection Reagent“

Unter Transfektion versteht man das Einbringen von Fremd-DNA in Zellkulturen. Die hier verwendete Transfektionsmethode mit „Effectene Transfection Reagent“ von Qiagen beruht auf DNA-Lipidkomplexen. Dabei wird die Plasmid-DNA ionisch an die Oberfläche der Liposomen gebunden, wobei DNA-Liposomen-Komplexe entstehen, die an die Zelloberfläche binden und in die Zelle aufgenommen werden. HeLa-S3-Zellen wurden am Tag der Transfektion wie unter 3.2.2.3. beschrie-

ben in kleine Zellkulturschalen (8,8 cm²) ausgesät und mit siRNA (3.2.3.1.) transfiziert. 8 h nach siRNA-Transfektion wurden die Zellen mit dem Plasmid transfiziert. Dazu wurden 2 µg DNA in 100 µl EC-Puffer gelöst. Nach Zugabe von 3,2 µl Enhancer wurde der Ansatz gevortext und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 10 µl „Effectene Transfection Reagent“ zugegeben und erneut gevortext. Nach zehnminütiger Inkubation bei RT wurden 600 µl Zellkulturmedium zur gelösten Plasmid-DNA gegeben und der DNA-Lipid-Komplex tropfenweise und unter schwenken auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden bis zur weiteren Behandlung bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

3.2.3.3. Transfektion von Plasmid-DNA und siRNA mit dem Nucleofector von Amaxa

Die hier verwendete Methode zur Transfektion von Fremd-DNA beruht auf Elektroporation, dabei werden durch einen elektrischen Puls kleine Poren in der Zellmembran erzeugt, durch die die zugegebene DNA und siRNA eindringen können. Die Poren verschließen sich innerhalb weniger Sekunden.

Wie unter 3.2.2.1. beschrieben wurde die 82-6hTert-Zelllinie trypsiniert und die Zellzahl bestimmt. Pro Ansatz wurden $1 \cdot 10^5$ Zellen in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und 7 min bei 200 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 100 µl vorgewärmter Nucleofector Solution V resuspendiert. Zu jedem Ansatz wurden 2,5 µg Plasmid-DNA sowie die in Tab. 3.5. gezeigte siRNA-Menge hinzugefügt. Anschließend wurde die Lösung luftblasenfrei in die Elektroporationsküvette überführt und mit dem Nucleofector ein Puls (Programm T030) gesetzt. Danach wurde die Lösung mit 500 µl RPMI-Medium in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in kleine Zellkulturschalen (8,8 cm²), Deckgläschen enthaltend, ausgesät und bis zur weiteren Behandlung 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

3.2.4. Röntgenbestrahlung

Die Bestrahlung der Zellen wurde in einer Röntgenröhre mit Wolfram-Anode bei einer Spannung von 90 kV und einer Stromstärke von 19 mA durchgeführt. In der verwendeten Bestrahlungshöhe von 30 cm über Austrittsfenster konnte somit nach Filterung durch 1 mm Aluminium eine Dosisleistung von 1,96 Gy/min erwartet werden. Diese wurde durch Fricke-Dosimetrie sowie durch Messung mit einem

PTW-Weichstrahlkammer-Dosimeter bestimmt und in regelmäßigen Abständen kontrolliert. Bei der Bestrahlung von auf Glasdeckgläschen wachsenden Zellen musste ein zusätzlicher Gewichtungsfaktor berücksichtigt werden, der sich durch Wechselwirkung der Röntgenbestrahlung mit Glas erklärt. Durch den Photoeffekt entstehen zusätzliche Sekundärelektronen, die die adhärennten Zellen erreichen und schädigen können. Diese werden jedoch nicht durch Fricke-Dosimetrie oder einem Dosimeter detektiert. Die effektiv verabreichte Dosis ist bei Bestrahlung auf Glasdeckgläschen um etwa Faktor 2 höher als bei Bestrahlung auf Kunststoffoberflächen wie z.B. Zellkulturflaschen (Kegel et al. 2007). Dieser Umstand wurde bei allen Dosisangaben in der vorliegenden Arbeit berücksichtigt.

3.2.5. Behandlung mit spezifischen Proteininhibitoren

Zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Proteine auf die Reparatur bzw. auf das Checkpoint-Verhalten wurden in dieser Arbeit Inhibitoren gegen die Checkpointkinasen Chk1/Chk2 (SB218078) und die cyclin-abhängigen-Kinasen (CDK) (Roscovitin) eingesetzt. Der Inhibitor für Chk1/Chk2 wurde erst nach vollständigem Einsetzen des Checkpoints bei 2 Gy nach 4 h in einer Endkonzentration von 2,5 μM hinzugegeben und bis zum Ablauf der Reparaturzeit inkubiert. Die Inhibitorbehandlung zur Hemmung der CDKs begann 1 h vor Bestrahlung mit einer Konzentration von 10 bzw. 25 μM und dauerte bis zum Ablauf der Reparaturzeit an.

3.2.6. Durchflusszytometrische Methoden

Die durchflusszytometrische Methode wurde vor allem zur Untersuchung des G2/M-Checkpoints durch Analyse des mitotischen Index genutzt. Dazu wurden exponentiell wachsende Zelle in kleinen Flaschen bzw. großen Schalen kultiviert und, wie unter 3.2.4. beschrieben, bestrahlt.

3.2.6.1. Zellernte und Fixierung für Durchflusszytometrie

Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung wurde das Medium in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt, die Zellen mit PBS gewaschen und dann wie unter 3.2.2.1. beschrieben abtrypsiniert und zum Medium in das Reaktionsgefäß gegeben. Nach erfolgter Zentrifugation (7 min, 300 x g, 4 °C) wurde der Überstand verworfen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend zentrifu-

giert (7 min, 300 x g, 4 °C). Die Fixierung erfolgte tropfenweise und unter Vortexen mit 2 ml 70 %igen eiskaltem Ethanol. Die fixierten Zellen wurden bis zur weiteren Verwendung bei - 20 °C gelagert.

3.2.6.2. phospho-H3 / Propidiumiodid-Färbung

Die Bestimmung des mitotischen Index erfolgte anhand des Nachweises von phosphoryliertem Histon 3, denn nur in mitotischen Zellen liegt das Histon 3 am Serin 10 phosphoryliert vor.

Dazu wurden die fixierten Zellen 7 min bei 300 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Zellsediment wurde erneut mit PBS gewaschen und wie oben zentrifugiert. Zur Permeabilisation der Zellen erfolgte ein 15minütiger Inkubationsschritt mit 0,25 % TritonX-100/PBS auf Eis. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen wurden die Zellen nach der Zentrifugation 5 h bei 4 °C mit 1 % BSA/PBS geblockt.

Das nach der Zentrifugation erhaltene Zellsediment wurde über Nacht bei 4 °C mit 100 µl Erstantikörperlösung (1:1300) inkubiert. Nach Zugabe von 1 % BSA/PBS und anschließender zehnminütiger Inkubation bei RT wurde erneut zentrifugiert und das Zellsediment 1 h bei RT und unter lichtgeschützten Bedingungen mit der Zweitantikörperlösung (1:500 goat anti-Kaninchen Alexa Fluor®488) inkubiert. Nach erneuter Inkubation mit 1 % BSA/PBS (10 min) und anschließender Zentrifugation konnte das Zellsediment in 500 µl Propidiumiodid-Lösung resuspendiert und 30 min bei RT unter lichtgeschützten Bedingungen inkubiert werden, bevor die Proben am Durchflusszytometer anhand des DNA-Gehaltes und des phospho-H3-Signals vermessen werden konnten.

3.2.6.3. Messung am Durchflusszytometer

Die Messung und Auswertung der Proben erfolgte unter Verwendung der Software „cellquest“ von der Firma Becton Dickinson. Das hier verwendete Durchflusszytometer verfügt über einen Argonlaser mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm. Die Messung des Propidiumiodid-Signals erfolgte im Fluoreszenzkanal 2 im Bereich von 564-606 nm, wohingegen das phospho-H3-Signal im Fluoreszenzkanal 1 im Bereich 505-545 nm aufgenommen wurde. Bei der Auswertung der durchgeführten Experimente wurden 30.000 Zellen erfasst.

3.2.7. Immunologische Methoden

In der vorliegenden Arbeit wurden immunologische Methoden vor allem dazu genutzt, das Reparaturverhalten in der G1- und G2-Phase verschiedener Protein-defizienter Zellen zu untersuchen. Dazu wurden exponentiell auf Deckgläschen wachsende Zellen, wie unter 3.2.4. beschrieben, bestrahlt und nach Bestrahlung zur Vermeidung der Auswertung bestrahlter S-Phase-Zellen in der G2-Phase mit Aphidicolin (3 µg/ml) und zur Vermeidung der Auswertung bestrahlter G2-Phase-Zellen in der G1-Phase mit Nocodazol (100 µg/ml) versetzt.

3.2.7.1. Fixierung der Zellen mit Formaldehyd

Nach Ablauf der Reparaturzeit wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und 15 min bei RT zur Fixierung mit 2,5 % Formaldehyd/PBS inkubiert. Die Zellen wurden nach dreimaligem Waschen mit PBS 10 min bei 4 °C mit 0,25 % TritonX-100/PBS/1%FCS zur Permeabilisierung der Zellmembran behandelt. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS/1%FCS wurden die Zellen 30 min bei RT mit 5 %iger BSA/PBS/1%FCS-Lösung blockiert. Bis zur weiteren Verwendung konnten die fixierten Deckgläschen bei 4 °C gelagert werden.

Bei den BrdU-Färbungen musste vor der Fixierung das Cytoplasma entfernt werden, dazu wurden die Zellen nach Ablauf der Reparaturzeit 5 min bei RT mit 0,5 % TritonX-100/PBS vorextrahiert. Um den Verlust von Zellen zu vermeiden, wurden alle folgenden Schritte nicht unter Schwenken durchgeführt. Anschließend 20 min mit 2,5 % Formaldehyd/PBS fixiert und erneut 20 min mit 0,5 % TritonX-100/PBS permeabilisiert. Nach 20minütigem Blocken bei RT mit 5 % BSA/PBS konnten die fixierten Deckgläschen bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert werden.

3.2.7.2. Rad51/γH2AX - Doppelfärbung

Um die Auswertung von γH2AX- und Rad51-Foci in ein- und derselben Zelle zu ermöglichen, wurde dieser Doppelfärbeansatz gewählt. Die unter 3.2.7.1. fixierten Zellen wurden über Nacht mit 25 µl Primärantikörperlösung (mouse anti-γH2AX (Ser139) 1:1000, rabbit anti-Rad51 1:15.000) inkubiert. Am nächsten Tag wurden die fixierten Zellen 3 mal 10 min unter Schwenken mit PBS/1%FCS gewaschen und anschließend 1 h mit 25 µl Zweitantikörperlösung (goat anti-rabbit Alexa Fluor®488 1:1000, goat anti-mouse Alexa Fluor®594 1:1000) unter lichtgeschützten Bedingungen inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS schloss

sich die unspezifische Färbung der DNA mit 0,2 µg/ml DAPI-Lösung für 4 min an. Anschließend wurden die Zellen für 10 min gewaschen, mit je 3 µl Mounting Medium eingedeckelt und mit Nagellack versiegelt. Die gefärbten Zellen konnten bis zur Auswertung lichtgeschützt bei 4 °C gelagert werden.

Die Auswertung der Foci erfolgte zellzyklusphasenspezifisch unter Benutzung der Metafer-Software wie unter 3.2.7.5.1. beschrieben.

3.2.7.3. BrdU-Resektion/CENP-F - Doppelfärbung

Dieser Färbeansatz diente dem Nachweis resektierter Doppelstrangbrüche in der G2-Phase. Die Färbung beruht auf dem Einbau von BrdU in die DNA anstelle des Thymidins während der Replikation. Hierfür mussten die Zellen 24 h mit BrdU (15 µM) markiert werden. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, bevor nach Zugabe von frischem Medium bestrahlt werden konnte. Nach Ablauf der Reparaturzeit wurden die Zellen fixiert (siehe 3.2.7.1.).

Die fixierten Zellen wurden über Nacht und bei 4 °C mit 25 µl Erstantikörperlösung (FITC mouse anti-BrdU 1:5, rabbit anti-CENP-F 1:1000) inkubiert und am nächsten Tag dreimal 10 min mit PBS/1%FCS gewaschen. Anschließend erfolgte die einstündige Inkubation mit dem Zweitantikörper (goat anti-rabbit Alexa Fluor®594 1:1000, goat anti-mouse Alexa Fluor®488 1:1000) unter lichtgeschützten Bedingungen bei RT. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS wurde die DNA unspezifisch für 4 min mit 0,2 µg/ml DAPI-Lösung gefärbt. Im Anschluss erfolgte ein vierminütiger Waschschrift mit PBS, bevor die Zellen mit 3 µl Mounting Medium eingedeckelt und mit Nagellack versiegelt werden konnten. Bis zur Auswertung wurden die Proben bei 4 °C gelagert.

Die Auswertung erfolgte zellzyklusphasenspezifisch unter Benutzung des CENP-F-Signals und der Metafer-Software wie unter 3.2.7.5.2. beschrieben.

3.2.7.4. BrdU-Einbau/CENP-F - Doppelfärbung

Die BrdU-Einbau/CENP-F – Doppelfärbung kann als Nachweis abgeschlossener homologer Rekombination genutzt werden. Hierfür müssen die Zellen erst nach Bestrahlung und dann bis zum Ablauf der Reparaturzeit mit BrdU (15 µM) markiert werden.

Nach der Fixierung (3.2.7.1) erfolgt die Inkubation des 1. Primärantikörpers über Nacht und bei 4 °C (rabbit anti-CENP-F 1:1000). Am folgenden Tag wurden die

Zellen zweimal mit PBS/1%FCS und einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde für 20 min ein Crosslink mit 2,5 % Formaldehyd/PBS bei RT durchgeführt. An ein erneutes einmaliges Waschen mit PBS und ein zweimaliges mit PBS/1%FCS schloss sich die Inkubation des 2. Primärantikörpers (mouse anti-BrdU, Roche 1:200) an. Zur Denaturierung der DNA befand sich der Antikörper im Inkubationspuffer (Roche) mit DNase (1 µg/ml) und wurde für 2-3 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS/1%FCS gewaschen und 1 h mit 25 µl Zweitantikörperlösung (goat anti-rabbit Alexa Fluor®488 1:1000, goat anti-mouse Alexa Fluor®594 1:1000) unter lichtgeschützten Bedingungen bei RT inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS konnte die DNA unspezifisch für 4 min mit 0,2 µg/ml DAPI-Lösung gefärbt werden. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, bevor sie mit je 3 µl Mounting Medium eingedeckelt und mit Nagellack versiegelt wurden. Bis zur Auswertung erfolgte die Lagerung bei 4 °C. Die zellzyklusphasenspezifische Auswertung erfolgte anhand der Analyse des CENP-F-Signals sowie der Benutzung der Metafer-Software (3.2.7.5.2).

3.2.7.5. Auswertung der immunologischen Methoden

3.2.7.5.1. Auswertung der γH2AX/Rad51-Färbung

Die Anzahl der γH2AX-Foci korreliert mit der Anzahl der unreparierten DNA-Doppelstrangbrüche. Zur Beurteilung des Reparaturverhaltens verschiedener defizienter Zellen wurde die Abnahme der γH2AX-Foci nach Ablauf verschiedener Reparaturzeiten gemessen. In den exponentiell wachsenden Zellen wurden in der Regel G1- und G2-Zellen ausgewertet. Die Unterscheidung der Zellzyklusphasen erfolgte automatisch mit Hilfe der Metafer-Software, wobei die DAPI-Intensität gegen das γH2AX-Signal aufgetragen wurde. Die G2-Zellen zeigen aufgrund des doppelten DNA-Gehaltes ein intensiveres DAPI-Signal im Vergleich zu G1-Zellen mit einfachem DNA-Gehalt. Zellen in der S-Phase, die einen DNA-Gehalt zwischen G1 und G2 aufweisen, konnten aufgrund des flächigen γH2AX-Signals infolge der Aphidicolinbehandlung ausgeschlossen werden. Die ausgewählten Zellen konnten aufgrund der Relokalisationsfunktion der Software angefahren und direkt am Mikroskop bei 1000facher Vergrößerung ausgewertet werden. Bei jedem Datenpunkt wurden mindestens 40 Zellen ausgewertet, dabei mussten mindestens 40 Foci erreicht werden.

3.2.7.5.2. Auswertung der BrdU/CENP-F-Färbung

Die BrdU-Foci korrelieren mit der Anzahl der resektierten DSBs bzw. den über HR reparierten DSBs. Zur Beurteilung des Reparaturverhaltens wurden die BrdU-Foci nach verschiedenen Reparaturzeiten in G2 gemessen. Die Unterscheidung der Zellzyklusphasen erfolgte automatisch mit Hilfe der Metafer-Software, wobei die DAPI-Intensität gegen das CENP-F (Centromer-F)-Signal aufgetragen wurde. CENP-F weist eine flächige Kernfärbung auf, die in der G2-Phase deutlich intensiver ist als in der späten S-Phase. Um die späten S-Phasen aus der Auswertung auszuschliessen, konnte weiterhin das BrdU-Signal bewertet werden, welches in den S-Phase-Zellen deutlich intensiver als in den G2-Zellen ist. Die ausgewählten G2-Zellen konnten mit Hilfe der Relokalisationsfunktion der Software angefahren werden und direkt am Mikroskop bei 1000facher Vergrößerung ausgewertet werden. Bei jedem Datenpunkt wurden mindestens 40 Zellen ausgewertet, dabei mussten mindestens 40 Foci erreicht werden.

3.2.8. Proteinanalytische Methoden

3.2.8.1. Zellernte und Zellyse

Nach Ablauf der Behandlungs- bzw. Reparaturzeit wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen, in PBS abgeschabt und 7 min bei 300 x g zentrifugiert. Im Anschluss an einen weiteren Waschschrift erfolgte der Aufschluss der Zellen durch Resuspension des Zellsediments in 50-200 µl Lysepuffer, Proteaseinhibitor *Complete* enthaltend, und Behandlung im Ultraschallbad (dreimal 1 min). Nach 30minütiger Inkubation auf Eis schloss sich ein Zentrifugationsschritt von 30 min bei 13.000 x g und 4 °C an. Das Zellysat (Überstand) wurde nach Proteinbestimmung (3.2.8.2.) bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

3.2.8.2. Proteingehalt-Bestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung der unter 3.2.8.1. gewonnenen Zellysate erfolgte mittels Bradford-Methode. Zunächst wurde mit unterschiedlichen Mengen BSA im Lysepuffer eine Eichkurve aufgenommen, wobei jeder Wert dreifach bestimmt wurde. Die Bestimmung des Proteingehaltes der Zellysate erfolgte ebenfalls durch eine Dreifachbestimmung anhand der erstellten Eichkurve. Je 1 µl Zellysat (unverdünnt bzw. bei zu hohen Extinktionswerten verdünnt) wurde in 800 µl Aqua dest. gege-

ben. Nach Zugabe von 200 µl Bradford-Reagenz wurde der Ansatz 5-10 min bei RT inkubiert und anschließend die Absorption bei 590 nm am Photometer gemessen.

3.2.8.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese können Proteine unterschiedlichen Molekulargewichtes unabhängig von ihrer Ladung oder Struktur aufgetrennt werden. Dabei werden die Proteine mit dem negativ-geladenen SDS in einem Verhältnis von 1:1,4 beladen und weisen so eine konstante negative Ladungsverteilung auf.

Es wurde ein Polyacrylamidgel verwendet. Dieses setzt sich aus zwei verschiedenen Gelen zusammen dem Trenngel und dem Sammelgel. Je nach Größe des nachzuweisenden Proteins wurden unterschiedlich prozentige Trenngele verwendet. Die Zusammensetzung der Gele ist in Tab. 3.6. dargestellt.

Tab. 3.6. Zusammensetzung für verschieden prozentige Trenngele und das Sammelgel

	5 %	7,5 %	10 %	12,5 %	Sammelgel
Rotiphere®Gel 30 (in ml)	6	9	12	15	2,2
1,5 M Tris/ HCl pH 8,8 14 mM SDS (in ml)	9	9	9	9	-
495 mM Tris/ HCl pH 6,8 14 mM SDS (in ml)	-	-	-	-	3,8
Aqua dest. (in ml)	21	18	15	12	9
APS (in µl)	200	200	200	200	100
TEMED (in µl)	20	20	20	20	40

Durch Zugabe von APS wurde die Polymerisation initiiert. Zunächst wurde das Trenngel bis auf dreiviertel Höhe der Glasapparatur gegossen, mit Isopropanol überschichtet und 45 min zur Polymerisierung belassen. Nach Entfernung des Isopropanols wurde das Sammelgel gegossen. In das frisch gegossene Sammelgel wurde ein Probenkamm eingesetzt und das Gel für ca. 30 min polymerisiert. Die Gelapparatur wurde in die Elektrophoresekammer eingebaut und mit Elektrophoresepuffer befüllt. Die unter 3.2.8.1. erhaltenen Proben wurden mit fünffach

SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C (bzw. 80 °C bei Proteinen ≥ 200 kDa) erhitzt. Im Anschluss an das Auftragen der Proben und des Proteinstandards zur Größenbestimmung der Proteine auf das Gel erfolgte die elektrophoretische Auftrennung für 2 h bei 50 mA.

3.2.8.4. Western Blot

Unter einem Western Blot versteht man die Übertragung der bei der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Membran und deren anschließende Detektion durch spezifische Antikörper.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde das Gel kurz im Transferpuffer äquilibriert. Weiterhin wurden 6 Filterpapiere und 2 Pads in Transferpuffer gelegt. Im Anschluss an die Aktivierung der PVDF-Membran im Methanol erfolgte der Aufbau des Tank-Blots (Abb. 3.2.).

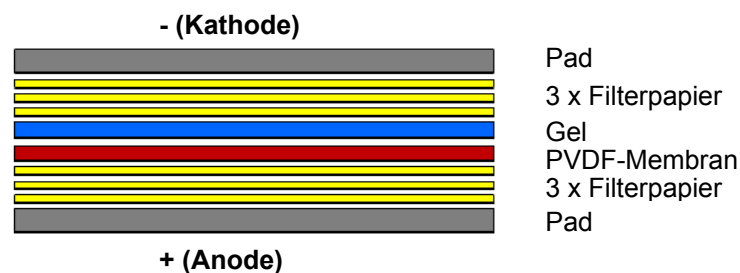


Abb. 3.2. schematische Darstellung des Tank-Blots

Die Übertragung der Proteine auf die PVDF-Membran erfolgte über Nacht bei einer konstanten Stromstärke von 80 mA. Zur Verhinderung unspezifischer Bindungen wurde die Membran nach dem Blotten 1 h bei 4 °C in einer Blockierlösung inkubiert. An das anschließende zweimalige Waschen (jeweils 10 min) der Membran schloss sich die Inkubation der Membran mit der Primärantikörperlösung für 1 h bei RT bzw. über Nacht bei 4 °C an. Zur Detektion der spezifischen Bindung des Primärantikörpers an das gewünschte Protein wurde die Membran nach erneutem dreimaligen Waschen mit Waschpuffer 1 h bei RT mit der Sekundärantikörperlösung (Goat Anti-Mouse IgG-HRP 1:10000, Goat Anti-Rabbit IgG-HRP 1:30.000) inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen der Membran erfolgte der Nachweis der Proteine auf der Basis von Chemilumineszenz, die durch den Meerettich-Peroxidase konjugierten Zweitantikörper vermittelt wurde. Dazu wurden Luminol und Enhancer-Lösung aus dem verwendeten „Lumilight kit“ nach Angaben des Herstellers im Verhältnis 1:1 gemischt und 1 min auf der Membran inkubiert. Die Detektion erfolgte dann am ChemiSmart5000.

3.2.8.5. Immunpräzipitation

Zur Anreicherung eines Proteins aus dem Zelllysatsatz nutzt man das Prinzip der spezifischen Bindung von Antikörpern und Antigenen. Bei der Immunpräzipitation wird ein Antikörper an ein festes Substrat (ProteinA, ProteinG) gekoppelt und so das gewünschte Protein spezifisch aus dem Zelllysatsatz angereichert.

Das ProteinA-Sepharose-Gemisch (1:3) wurde zunächst dreimal mit PBS gewaschen und 2 min bei 500 x g zentrifugiert. Pro Probe wurden jeweils drei Ansätze (1. Vorpräzipitat, 2. Vorpräzipitat und Immunpräzipitat) à 30 µl ProteinA-Sepharose benötigt. Im ersten Schritt wurde das 2. Vorpräzipitat sowie das Immunpräzipitat mit 10 % BSA/PBS zur Vermeidung unspezifischer Bindungen blockiert während das 1. Vorpräzipitat mit 1,5 mg Zelllysatsatz für 90 min bei 4 °C inkubiert wurde. Nach anschließender Zentrifugation (2 min, 500 x g) wurde der Überstand des 1. Vorpräzipitates auf das ProteinA-Sepharose-Gemisch des 2. Vorpräzipitates überführt während das Immunpräzipitat zur Bindung des Erstantikörpers an das ProteinA mit 150 µl Primärantikörperlösung (rabbit anti-cdc25C-NT 1:6) 90 min bei 4 °C inkubiert wurde. Nach erneuter Zentrifugation der Präzipitate (2 min, 500 x g), wurde der Überstand des 2. Vorpräzipitates zum spezifischen Binden des cdc25C an den Antikörper auf das ProteinA-Sepharose-Gemisch des Immunpräzipitates überführt und 90 min bei 4 °C inkubiert während das ProteinA-Sepharose-Gemisch des 2. Vorpräzipitates mit 200 µl Zelllysepuffer inkubiert wurde. Nach erfolgter Zentrifugation (2 min, 500 x g) wurde das 2. Vorpräzipitat und das Immunpräzipitat 3 mal mit Zelllysepuffer gewaschen und anschließend für die Western Blot-Analyse und den cdc25C-Aktivitäts-Assay weiter verwendet. Der Ablauf der Immunpräzipitation ist in Abb.3.3. schematisch dargestellt.

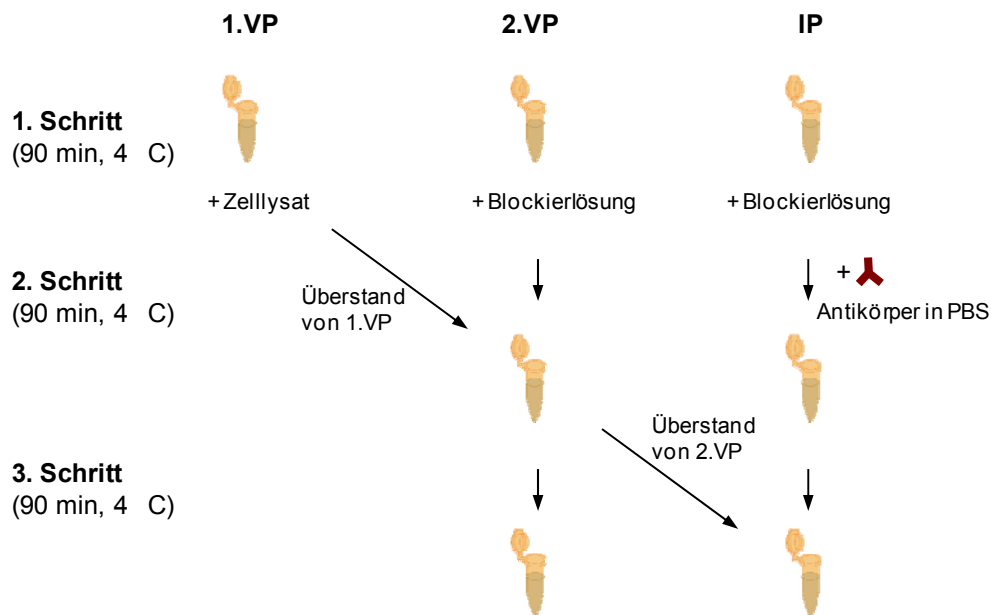



Abb. 3.3. schematischer Ablauf der Immunpräzipitation.
Das ProteinA-Sepharose-Gemisch ist durch  gekennzeichnet.

3.2.8.6. cdc25C Aktivitätstest

Die Bestimmung der Aktivität der Cdc25C-Phosphatase beruht auf der Umsetzung des nicht fluoreszierenden Fluoresceindiphosphat in das fluoreszierende Fluorescein (Abb. 3.4.).

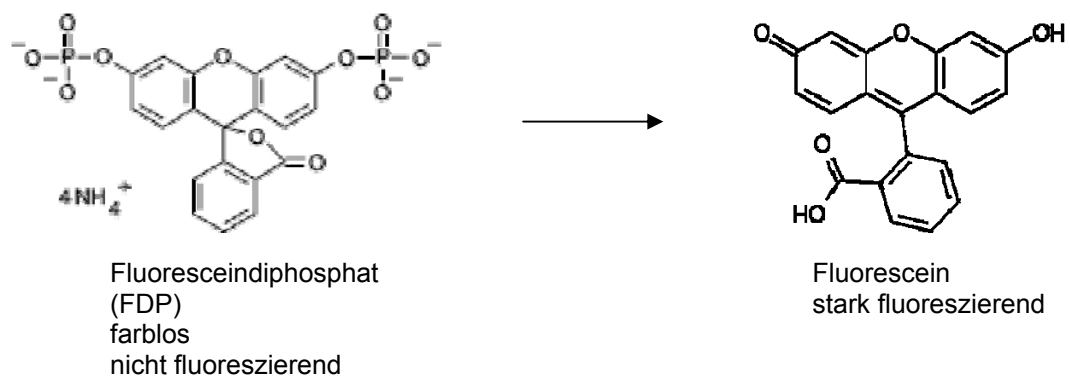


Abb. 3.4. Phosphatase – FDP/ Fluorescein Farbreaktion

Die unter 3.2.8.5. erhaltenen Proben wurden mit 200 µl FDP-Puffer gewaschen und 2 min bei 500 x g zentrifugiert. Im Anschluss an die Auffüllung des ProteinA-Sepharose-Gemischs auf 30 µl mit FDP-Puffer und der Zugabe von 120 µl FDP-Lösung wurden die Ansätze in eine 96 well Platte pipettiert und am Fluorometer (Tecan) 2 h alle 10 min vermessen (Anregung 485 nM, Emission 535 nM). Pro

Ansatz wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Auswertung der Aktivität erfolgte über die Änderung der Extinktion (dimensionslos) in Bezug auf die Zeit. Zur Berechnung der Aktivität pro Minute diene folgende Formel:

$$\text{Aktivität} / \text{min} = \frac{E(\text{Ende})}{E(\text{Beginn})} * \frac{1}{t(\text{min})}$$

4. Ergebnisse

4.1. Rolle von p53 am G2/M-Checkpoint

4.1.1. Untersuchung zur Rolle von p53 am G2/M-Checkpoint bei einer Strahledosis von 1 Gy

Das meist mutierte Gen in den verschiedenen menschlichen Krebsarten ist das Tumorsuppressorgen p53. Daher ist die Aufklärung der Funktion von p53 von großer Bedeutung. Das p53-Protein besitzt eine Reihe von Funktionen, unter anderem in der Zellzykluskontrolle, bei der Induktion der Apoptose und bei der Regulation von Proteinen, die an der DNA-Reparatur beteiligt sind. Bisherige Studien befassen sich hauptsächlich mit der Rolle von p53 am G1/S-Checkpoint. Zellen ohne p53 verlieren den G1/S-Checkpoint und progressieren mit DNA-Schäden in die S-Phase (Kuerbitz et al. 1992, Kastan et al. 1992). Im Gegensatz zum G1/S-Checkpoint ist die Funktion von p53 am G2/M-Checkpoint noch relativ ungeklärt und sollte im ersten Teil dieser Arbeit näher untersucht werden.

Die nachfolgenden Versuche wurden in humanen Kolonkarzinomzellen (HCT116) mit unterschiedlichem p53-Status durchgeführt. Zum einen wurden p53-Wildtyp (p53wt) Zellen verwendet, in denen auch eine Behandlung mit KsiRNA bzw. p53siRNA erfolgte, und zum anderen p53-defiziente (p53^{-/-}) Zellen. Als Kontrolle des p53-Status diente der Nachweis mittels Western-Blot-Analyse. Dabei konnte gezeigt werden, dass in p53-defizienten bzw. p53siRNA-transfizierten Zellen kein p53 nachweisbar ist (Abb. 4.1. A). Bei der Transfektion mit der siRNA wurden Wildtypzellen zum Vergleich mit einer Negativkontroll-siRNA (KsiRNA) transfiziert, die nur von der Zelle aufgenommen wird, aber nicht an die mRNA bindet.

Zur Erforschung des Einflusses von p53 auf den G2/M-Checkpoint wurde zunächst der Verlauf des mitotischen Index nach Röntgenstrahlung untersucht. Die Überprüfung des mitotischen Index nach Bestrahlung beruht auf der spezifischen Phosphorylierung des Histons H3 am Serin 10 während der Chromosomenkondensation. Diese Phosphorylierung ist als Marker für mitotische Zellen beschrieben (Paulson und Taylor 1982). Die Messung der mitotischen Zellen erfolgte nach spezifischer Antikörperfärbung am Durchflusszytometer. Zur Analyse der Zellzyklusverteilung der Gesamtpopulation wurde zusätzlich der interkalierende DNA-Farbstoff Propidiumiodid (PI) verwendet. Zur Auswertung der Proben wurde das phospho-Histon-H3- (pH3-) Signal in einem Dotplot gegen den DNA-Gehalt aufgetragen (Abb. 4.1. B). Zellen mit einfachem DNA-Gehalt stellen die G1-Population dar, während diejenigen mit doppeltem DNA-Gehalt die G2-Population aufzeigen. Zellen, die einen DNA-Gehalt zwischen

G1 und G2 aufweisen, befinden sich in der S-Phase. Die pH3-positiven Zellen setzen sich deutlich von den negativen Zellen ab und liegen oberhalb der G2-Population (Abb. 4.1. B). Der Anteil der mitotischen Zellen an der Gesamtpopulation, der bei unbehandelten und exponentiell wachsenden HCT116-Zellen zwischen 1,5-2,5 % liegt, konnte somit bestimmt werden. Zur Untersuchung des G2/M-Checkpoints wurde der Verlauf des mitotischen Index in den p53wt und p53-/- Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung ausgewertet. Nach der Bestimmung des Anteiles der mitotischen Zellen an der Gesamtpopulation wurde der mitotische Index zu jedem Zeitpunkt nach der Bestrahlung auf den der unbestrahlten Kontrolle normiert und im Diagramm dargestellt (Abb. 4.1. C-H).

Nach der Applikation der Strahlendosis von 1Gy sinkt in p53wt Zellen der mitotische Index innerhalb der ersten 2 h nach Bestrahlung ab und erreicht ca. 20 % des Kontrollwertes, da aufgrund des induzierten DNA-Schadens der G2/M-Checkpoint einsetzt und die Zellen nicht in die Mitose eintreten. 4 h nach Bestrahlung steigt der mitotische Index wieder an, da die ersten Zellen sind in der Lage, die G2-Phase zu verlassen und ihren Zellzyklus mit dem Übertritt in die Mitose fortzusetzen (Abb. 4.1. C, D). Bei einer Erhöhung der Strahlendosis auf 6 Gy setzt der G2/M-Checkpoint stärker ein. Weiterhin bleibt der mitotische Index im gesamten Beobachtungszeitraum konstant bei 8-10 %, da die Zellen die G2-Phase aufgrund des erhöhten Schadensniveaus nicht verlassen (Abb. 4.1. E). Das Einsetzen bzw. das Aufheben des G2/M-Checkpoints korreliert somit mit der Strahlendosis.

Der mitotische Index in p53-/- Zellen nimmt im Vergleich zu den Wildtypzellen innerhalb der ersten 2 h nach Bestrahlung deutlich schwächer ab und fällt nur auf 40-50 % des Wertes unbestrahlter Zellen ab, was auf einen unvollständig einsetzenden G2/M-Checkpoint hindeutet. Auch eine Erhöhung der Strahlendosis auf 6 Gy führt nur zu einem leicht stärkeren Abfall des mitotischen Index. Somit ist weiterhin ein unvollständiges Einsetzen des G2/M-Checkpoints zu beobachten. Ein weiterer Unterschied zu den Wildtypzellen stellt der Wiedereintritt der Zellen in den Zellzyklus dar. So bleibt der mitotische Index in den p53-/- Zellen bereits nach einer applizierten Strahlendosis von 1Gy im gesamten Beobachtungszeitraum konstant auf dem Niveau, das 2 h nach Bestrahlung erreicht wird (Abb. 4.1. F-H).

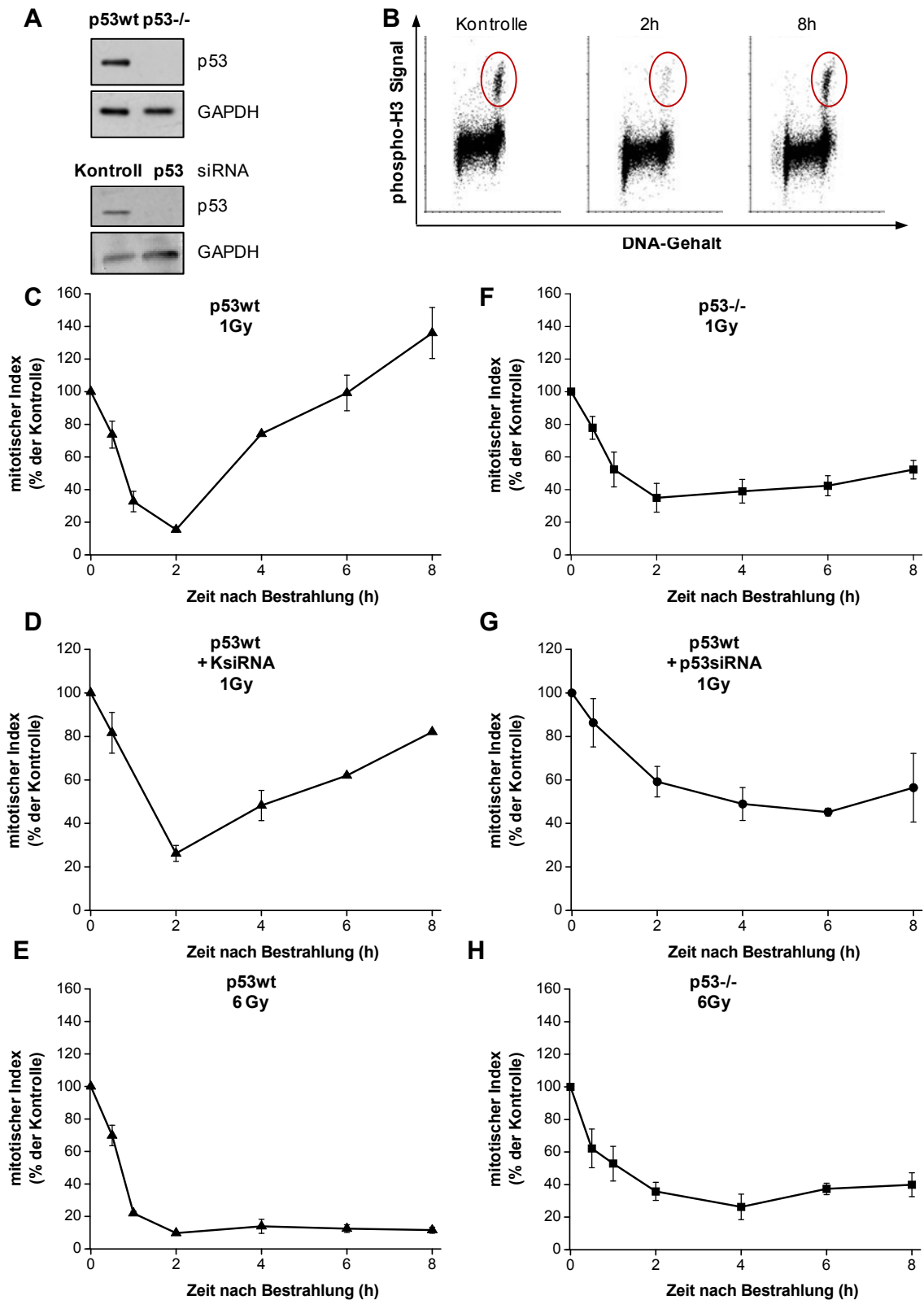


Abb. 4.1. Einfluss von Röntgenstrahlung auf den G2/M-Checkpoint exponentiell wachsender humaner Tumorzellen mit unterschiedlichem p53-Status

(A) Western-Blot-Analyse. 48 h nach siRNA (p53siRNA 10 nM, KsiRNA 10 nM) Transfektion erfolgte der Aufschluss der HCT116-Zellen durch Lysepuffer und Ultraschallbehandlung. 40 µg Gesamtprotein wurden über SDS-Page elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und mit spezifischen Antikörpern gegen p53 und GAPDH inkubiert. Die Detektion der Banden erfolgte über ein Chemilumineszenz-Kit.

(B-H) Durchflusszytometrische Analyse von humanen Tumorzellen (HCT116) mit unterschiedlichem p53-Status. Exponentiell wachsende p53wt, p53^{-/-} und p53siRNA-transfizierte HCT116-Zellen wurden mit 1 Gy **(C-D, F-G)** und 6 Gy **(E, H)** bestrahlt und anschließend für 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h kultiviert. Nach erfolgter Fixierung wurden die mitotischen Zellen spezifisch mit einem Antikörper gegen pH3 (Ser10) und der DNA-Gehalt unspezifisch mit Propidiumiodid (PI) gefärbt. Als Kontrolle wurden unbestrahlte Zellen identisch behandelt. Nach der Vermessung am FACS konnte der ermittelte DNA-Gehalt (X-Achse, dimensionslos, linear) in einem Dot-Plot gegen das spezifische pH3-Signal (Y-Achse, dimensionslos, logarithmisch) aufgetragen werden **(B)**. Nach Bestimmung des Anteils der mitotischen Zellen an der Gesamtpopulation wurden die mitotischen Zellen zu jedem Zeitpunkt auf den mitotischen Index der unbestrahlten Kontrolle normiert **(C-H)**. Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 Experimenten. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler zwischen den Experimenten dar.

Zusammenfassend zeigen diese ersten Ergebnisse, dass p53 sowohl eine Rolle beim Einsetzen des G2/M-Checkpoints als auch beim Wiedereintritt in die Mitose spielt.

4.1.2. Untersuchung des unvollständigen Einsetzens des G2/M-Checkpoints in p53^{-/-} Zellen

Die p53-defiziente Zellen zeigen einen unvollständigen G2/M-Checkpoint, der unabhängig von der applizierten Strahlendosis ist (Abb. 4.1. F-H). Es ist denkbar, dass in Abwesenheit von p53 auch nach der Bestrahlung weiter Zellen in die Mitose eintreten und gleich viele die Mitose verlassen, so dass ein Gleichgewicht zwischen dem Eintritt und dem Austritt in die bzw. aus der Mitose vorliegt. Es ist aber auch möglich, dass in den Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der Mitose befinden, aufgrund von strahleninduzierten DNA-Schäden ein mitotischer Checkpoint einsetzt. Ob eine der beiden Möglichkeiten für das unvollständige Absinken des mitotischen Index in Frage kommt, sollte im Folgenden getestet werden. Die Zellen wurden dazu unmittelbar nach der Bestrahlung mit Nocodazol behandelt. Bei Nocodazol handelt es sich um ein Mikrotubuli-Depolymerisierungsagens, das die Zellen an der Polymerisierung der Mikrotubuli hindert und somit die Ausbildung der Metaphasespindeln hemmt. Somit kann durch Unterbinden des Verlassens der Mitose überprüft werden, ob auch nach Bestrahlung dauerhaft Zellen in die Mitose eintreten. Ein ständiges Eintreten in die Mitose, sollte sich in einem Anstieg des mitotischen Index äußern. Der mitotische Index wurde wie unter 4.1.1. beschrieben anhand des DNA-Gehalts und des pH3-Signals ausgewertet.

Innerhalb der ersten Stunden nach Bestrahlung mit 1 Gy kann kein Abfall des mitotischen Index beobachtet werden, da die Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der Mitose befanden, die Mitose aufgrund der Nocodazol-Zugabe nicht abschließen konnten und somit in dieser Zellzyklusphase verharren. In p53wt Zellen

kann zwischen 2-4 h nach Bestrahlung eine Zunahme des mitotischen Index beobachtet werden (Abb. 4.2. A), was mit dem nachgewiesenen Aufheben des G2/M-Checkpoints übereinstimmt (Abb. 4.1. C-D). Dagegen bleibt der mitotische Index in p53^{-/-} Zellen im gesamten Beobachtungszeitraum konstant (Abb. 4.2. B). Dies widerlegt die Vermutung eines Gleichgewichts zwischen Ein- und Austritt in die bzw. aus der Mitose, da kein Anstieg der mitotischen Zellen beobachtet werden kann. Das Absinken des mitotischen Index auf nur 40-50 % von dem Kontrollwert in p53^{-/-} Zellen (Abb. 4.1. F-H) ist daher auf ein Arretieren der mitotischen Zellen nach strahleninduzierten DNA-Schäden zurückzuführen. Der G2/M-Checkpoint setzt demzufolge auch in p53^{-/-} Zellen vollständig ein.

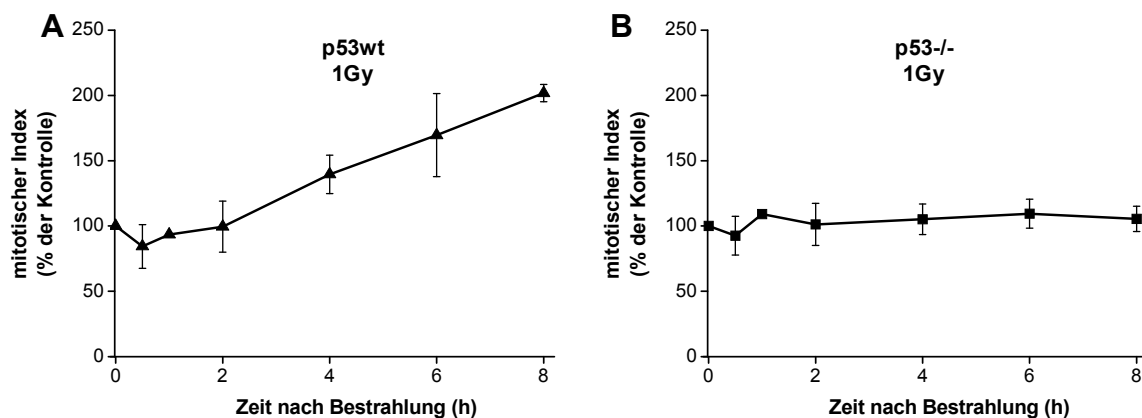


Abb. 4.2. Einfluss von Nocodazol auf den mitotischen Index exponentiell wachsender humaner Tumorzellen mit unterschiedlichem p53-Status

(A, B) Durchflusszytometrische Analyse von humanen Tumorzellen (HCT116) mit unterschiedlichem p53 Status. Exponentiell wachsende p53wt (A) und p53^{-/-} (B) Zellen wurden mit 1 Gy bestrahlt und mit Nocodazol versetzt. Anschließend für 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h und 8 h kultiviert. Nach erfolgter Fixierung wurden die mitotischen Zellen spezifisch mit einem Antikörper gegen pH3 (Ser10) und der DNA-Gehalt unspezifisch mit PI gefärbt. Als Kontrolle wurden unbestrahlte Zellen identisch behandelt. Die Normierung des mitotischen Index der einzelnen Zeitpunkte erfolgte auf den Anteil der mitotischen Zellen der unbestrahlten Kontrolle. Dargestellt ist der Mittelwert aus 2 Experimenten. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte.

4.1.3. Untersuchung zur Rolle von p53 am G2/M-Checkpoint bei einer Strahlendosis von 12 Gy

Die bisherigen Ergebnisse verdeutlichen, dass das Einsetzen des G2/M-Checkpoints nach strahleninduzierten Schäden unabhängig vom p53-Status ist. Für den Wiedereintritt in den Zellzyklus benötigen die Zellen dagegen p53. In einer früheren Veröffentlichung wurde jedoch postuliert, dass p53 für die Aufrechterhaltung des G2/M-Checkpoints vonnöten ist (Bunz et al. 1998). So zeigte Bunz et al., dass p53wt Zellen nach Bestrahlung mit 12 Gy in der G2-Phase arretiert bleiben, was sich auch in der

vorliegenden Arbeit bei einer Strahlendosis von 6 Gy (Abb. 4.1. E) beobachten lässt. Die p53-defizienten Zellen verlassen dagegen den G2-Arrest und treten in die Mitose über. Im Unterschied zu der vorliegenden Arbeit wurden in Bunz et al. (1998) die Zellen mit einer Strahlendosis von 12 Gy bestrahlt, während die hier verwendete Dosis 1 Gy beträgt. Zur Überprüfung, ob die Funktion von p53 von dem entstandenen Schadensniveau abhängig ist, wurden die Versuche aus Bunz et al. mit den in der vorliegenden Arbeit verwendeten HCT116-Zelllinien wiederholt. Dazu wurden p53wt und p53^{-/-} Zellen mit 12 Gy bestrahlt und zu verschiedenen Zeitpunkten fixiert und, wie unter 4.1.1. beschrieben, anhand des pH3- und PI-Signals ausgewertet.

Konform zu den Ergebnissen von Bunz et al. konnte gezeigt werden, dass p53wt Zellen bei einer Dosis von 12 Gy nach Einsetzen des G2/M-Checkpoints keinen Anstieg des mitotischen Index aufzeigen und somit in der G2-Phase arretiert bleiben (Abb. 4.3. A), während bei p53^{-/-} Zellen ein Anstieg der mitotischen Zellen 48 h nach Bestrahlung beobachtet werden kann, d.h. Zellen ohne p53 überwinden den G2/M-Checkpoint nach längeren Zeitpunkten und treten in die Mitose ein. Nach 96 h fällt der mitotische Index wieder leicht ab (Abb. 4.3. B).

Dieser Versuch lässt darauf schließen, dass bei Induktion eines großen Schadenniveaus, aufgrund von hohen Strahlendosen, p53 für die Aufrechterhaltung des G2/M-Checkpoints notwendig zu sein scheint.

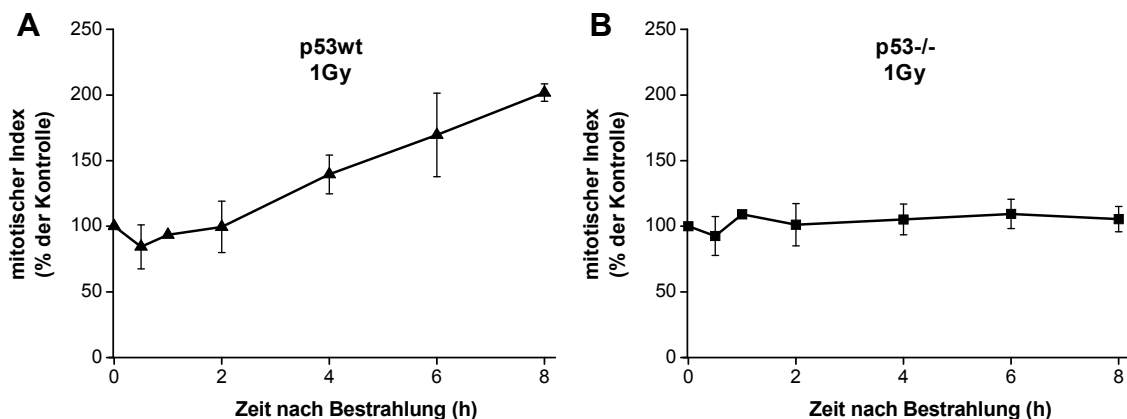


Abb. 4.3. Einfluss von 12 Gy Röntgenstrahlung auf den G2/M-Checkpoint exponentiell wachsender humaner Tumorzellen mit unterschiedlichem p53-Status

(A, B) Durchflusszytometrische Analyse von humanen Tumorzellen (HCT116) mit unterschiedlichem p53-Status. Exponentiell wachsende p53wt (A) und p53^{-/-} (B) HCT116-Zellen wurden mit 12 Gy bestrahlt. Nach 30 min wurde Nocodazol zu den Zellen gegeben und anschließend für 24 h, 48 h, 72 h und 96 h kultiviert. Nach erfolgter Fixierung wurden die mitotischen Zellen spezifisch mit einem Antikörper gegen pH3 (Ser10) und der DNA-Gehalt unspezifisch mit PI gefärbt. Als Kontrolle wurden unbestrahlte Zellen identisch behandelt. Die Auswertung der mitotischen Zellen erfolgte anhand des spezifischen pH3 (Ser10)-Signals und der Normierung auf die unbestrahlte Kontrolle. Dargestellt ist ein Experiment.

Neben dem Wiedereintritt in den Zellzyklus wies Bunz et al. nach, dass die p53-defizienten Zellen vermehrt die Apoptose einleiten. Zur Überprüfung dieser Beobachtung wurde ein indirekter Apoptosenachweis durchgeführt, indem der DNA-Gehalt ausgewertet wurde. Dafür wurden die Zellereignisse gegen den DNA-Gehalt in einem Histogramm aufgetragen und die Zellzyklusphasen anhand des DNA-Gehalts, wie unter 4.1.1. beschrieben, bestimmt. Neben den G1-, S- und G2-Zellen kann ein zusätzliches Signal nachgewiesen werden, was von Zellen mit geringerem DNA-Gehalt als G1-Zellen stammt. Diese als Sub-G1 bezeichneten Zellen sind ein Zeichen für apoptotische Zellen (Abb. 4.4. A).

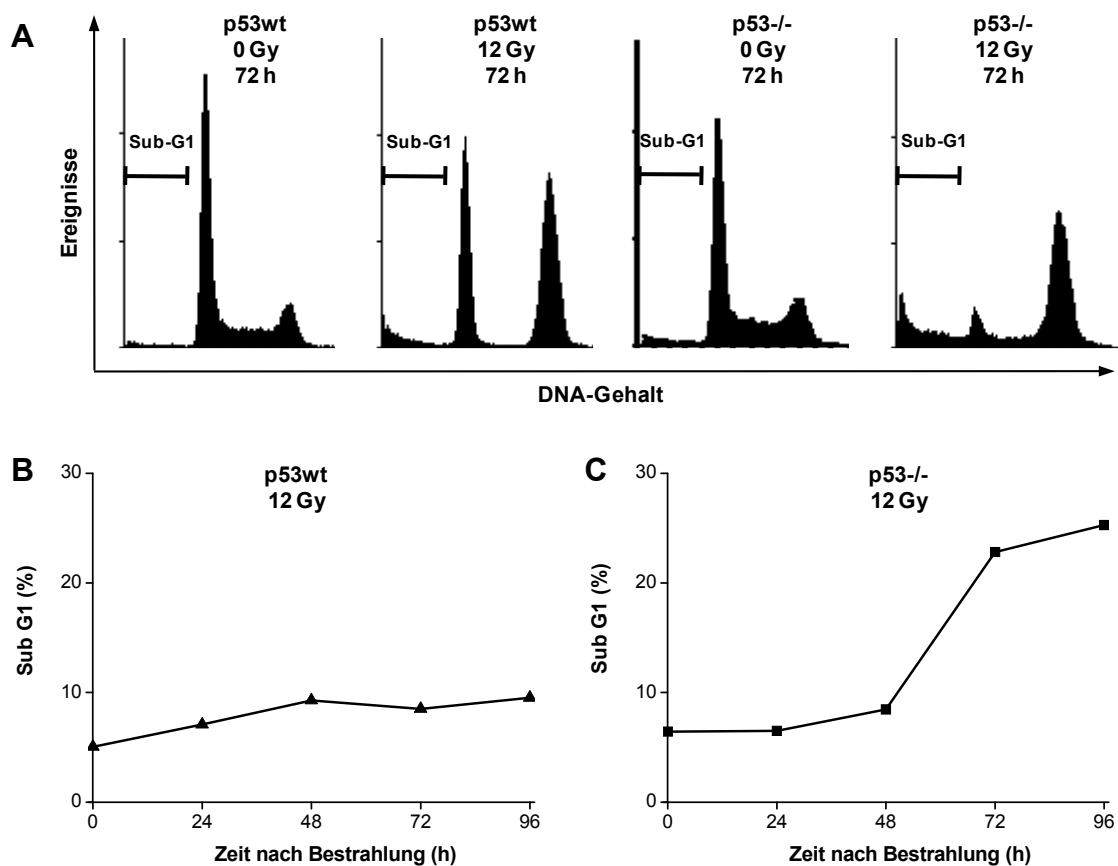


Abb. 4.4. Einfluss von 12 Gy Röntgenstrahlung auf den G2/M-Checkpoint exponentiell wachsender humaner Tumorzellen mit unterschiedlichem p53-Status

(A-C) Durchflusszytometrische Analyse von humanen Tumorzellen (HCT116) mit unterschiedlichem p53-Status. Exponentiell wachsende p53wt (A, B) und p53-/- (A, C) HCT116-Zellen wurden mit 12 Gy bestrahlt und nach 30 min mit Nocodazol versetzt. Die Zellen wurden für 24 h, 48 h, 72 h und 96 h kultiviert. Nach erfolgter Fixierung wurde der DNA-Gehalt unspezifisch mit PI gefärbt. Als Kontrolle wurden unbestrahlte Zellen identisch behandelt. Die Auswertung der Sub-G1-Population (A-C) erfolgte anhand des DNA-Gehalts durch Auftragung der Zellereignisse (Y-Achse, dimensionslos, linear) gegen den DNA-Gehalt (X-Achse, dimensionslos, linear) in einem Histogramm (A). Nach Bestimmung des Anteils des Sub-G1-Signals an der Gesamtpopulation wurde die Sub-G1-Fraktion zu jedem Zeitpunkt dargestellt. Gezeigt ist ein Experiment.

Bei der Untersuchung des Sub-G1-Signals fällt auf, dass bei p53^{-/-} Zellen 72 h nach Bestrahlung kaum noch Zellen in der G1-Phase zu finden sind, während die Zellen mit p53^{wt} immer noch einen hohen G1-Anteil aufweisen (Abb. 4.4. A). Diese Beobachtung ist auf die bekannte Funktion von p53 beim Einsetzen des G1/S-Checkpoints zurückzuführen (Kuerbitz et al. 1992, Kastan et al. 1992). Wie nach Bunz et al. zu erwarten war, zeigen die p53^{-/-} Zellen einen deutlichen Anstieg des Sub-G1-Signals auf ca. 25 % während bei p53^{wt} Zellen nur ein leichter Anstieg zu beobachten ist (Abb. 4.4. B, C).

Zusammenfassend lassen die bisherigen Ergebnisse darauf schließen, dass die Funktion von p53 von der Höhe des induzierten DNA-Schadens abhängig ist und somit bei unterschiedlichen Dosen verschiedene Reaktionen der Zellen hervorgerufen werden. Das p53-Protein scheint demnach nach Induktion eines hohen Schadenniveaus für die Aufrechterhaltung des G2/M-Checkpoints verantwortlich zu sein, während bei Induktion eines geringeren Schadenniveaus die Bedeutung von p53 beim Wiedereintritt in den Zellzyklus liegt.

4.1.4. Untersuchung der Rolle von p53 am G2/M-Checkpoint auf Proteinebene bei einer Strahlendosis von 1 Gy

Die Funktion von p53 beim Wiedereintritt in die Mitose nach Applikation einer Strahlendosis von 1 Gy sollte neben der Messung mitotischer Zellen auch auf Ebene der am G2/M-Checkpoint beteiligten Proteine untersucht werden. Der Übergang von einer Zellzyklusphase in die nächste wird durch Cyclin-abhängige Kinasen (*Cyclin Dependent Kinases*, CDK) kontrolliert. Die CDKs bilden dabei Komplexe mit Zellzyklusphasen-spezifischen Cyclinen (Doree und Galas 1994). Die Aktivierung der CDKs erfolgt nach Induktion einer Phosphorylierungskaskade. Der G2/M-Checkpoint wird durch den CyclinB/CDK1-Komplex reguliert, der durch die Phosphatase Cdc25C aktiviert werden kann. Nach Auftreten eines DNA-Schadens in einer G2-Zelle werden zunächst die Checkpointkinasen Chk1/Chk2 aktiviert. Diese Kinasen inaktivieren nun das Cdc25C durch Phosphorylierung am Serin 216. Dies hat den Export des Cdc25C aus dem Zellkern zur Folge. Somit kann das Cdc25C den CyclinB/CDK1-Komplex nicht länger durch Dephosphorylierung aktivieren, und die Zelle bleibt in der G2-Phase arretiert (Chan et al. 1999, Lam und Rosen 2004). Zur Bestätigung der Funktion von p53 am G2/M-Checkpoint wurde zunächst das inaktive phospho-Cdc25C (Ser216) (p-Cdc25C) nach Bestrahlung mit 1 Gy in p53^{wt} und p53^{-/-} HCT116-Zellen

untersucht. Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet. Nach Aufschluss der Zellen wurde das Zelllysate über die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt, die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert und diese anschließend mit spezifischen Antikörpern detektiert.

Zunächst konnte bei Betrachtung der Gesamtmenge an Cdc25C gezeigt werden, dass in p53^{-/-} Zellen im Vergleich zu p53^{wt} Zellen eine erhöhte Proteinmenge an Cdc25C zu beobachten ist (Abb. 4.5. A). Für den Nachweis der phosphorylierten Form (Ser216) wurde zunächst die Spezifität des Antikörpers durch Behandlung des Zelllysats mit alkalischer Phosphatase überprüft. Es zeigt sich, dass die Phosphorylierung von Cdc25C aufgrund der Behandlung mit alkalischer Phosphatase abnimmt (Abb. 4.5. B). Der p-Cdc25C (Ser216) Antikörper ist somit phosphospezifisch und eignet sich für den Nachweis des p-Cdc25C (Ser216) in den folgenden Untersuchungen.

Innerhalb der ersten Stunden kann sowohl in p53^{wt} als auch in p53^{-/-} Zellen ein Anstieg der Menge des p-Cdc25C (Ser216) beobachtet werden (Abb. 4.5. C-D). Dies korreliert mit dem unter 4.1.1. gezeigten Einsetzen des G2/M-Checkpoints. In p53^{wt} Zellen nimmt die Menge des p-Cdc25C (Ser216) 6 h nach Bestrahlung wieder ab (Abb. 4.5. B), da die Zellen in die Mitose übergehen. Die Menge an p-Cdc25C (Ser216) in p53^{-/-} Zellen steigt dagegen auch zu den späteren Zeitpunkten weiter an (Abb. 4.5. D). Dies bestätigt das Ergebnis des mitotischen Index (4.1.1.), dass Zellen ohne p53 nach einer Strahlendosis von 1 Gy in der G2-Phase arretiert bleiben und ein Wiedereintritt in die Mitose ausbleibt.

Ein weiterer Nachweis für das Aufheben des G2/M-Checkpoints erfolgte über die Gesamtproteinmenge von Polo-like Kinase 1 (Plk1), die für den Rücktransport des Cdc25C erforderlich ist. Die durch das Einsetzen des G2/M-Checkpoints in das Zytoplasma transportierte inaktive, phosphorylierte Form von Cdc25C muss zum Aufheben des G2-Arrests zurück in den Zellkern gebracht werden. Dieser Rücktransport wird durch eine Phosphorylierung des Cdc25C am Serin 198 begünstigt, die durch die Plk1 erfolgt (Toyoshima-Morimoto et al. 2002). Beim Nachweis der Plk1 fällt zunächst auf, dass Zellen ohne p53 im Vergleich zu Zellen mit p53 eine deutlich erhöhte Ausgangsproteinmenge an Plk1 besitzen. Weiterhin kann in p53^{wt} Zellen 3 h nach Bestrahlung eine Hochregulation von Plk1 beobachtet werden (Abb. 4.5. E), was konform zum beobachteten Aufheben des G2/M-Checkpoints in Abb. 4.1. C, D ist. Die Gesamtproteinmenge von Plk1 in p53^{-/-} Zellen bleibt während des gesamten

Beobachtungszeitraums konstant (Abb. 4.5. E). Der ausbleibende Anstieg der Proteinmenge von Plk1 korreliert mit dem gleichbleibenden mitotischen Index in p53^{-/-} Zellen nach Bestrahlung mit 1 Gy (Abb. 4.1. F, G).

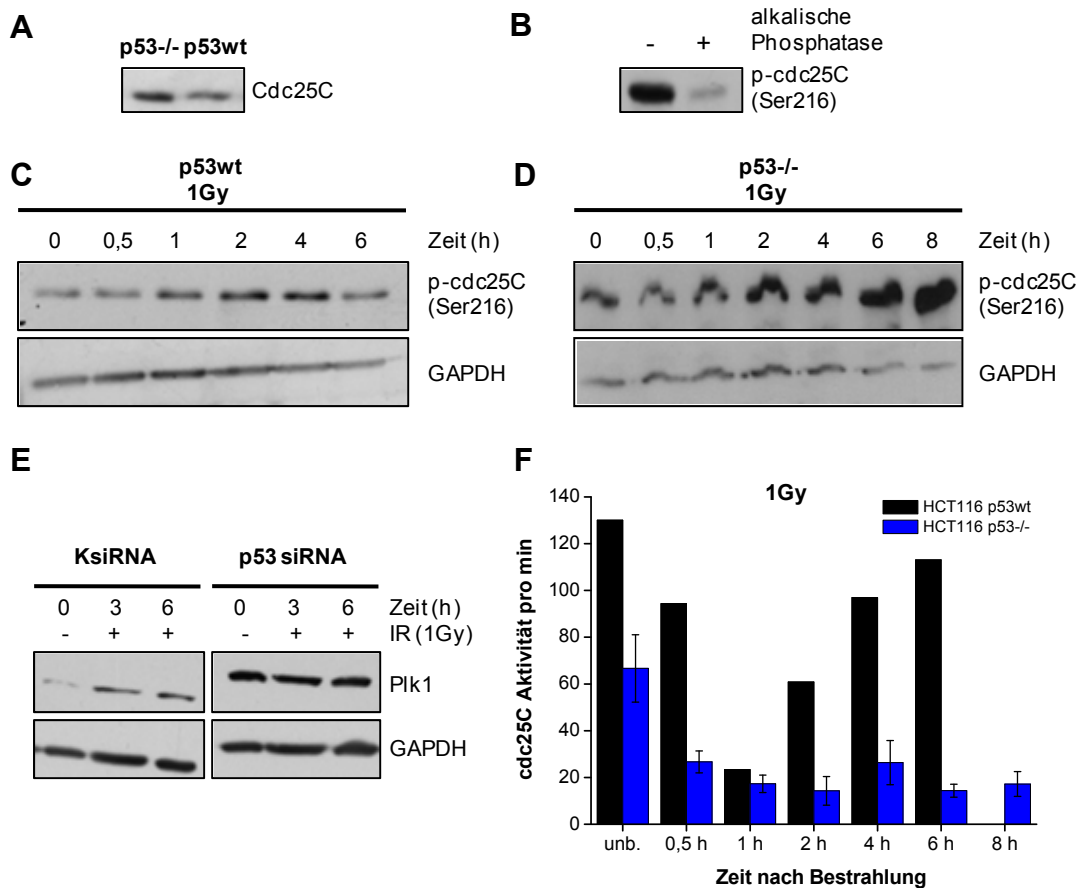


Abb. 4.5. Nachweis des G2/M-Checkpoints anhand von cdc25C bei exponentiell wachsenden humanen Tumorzellen mit unterschiedlichem p53-Status

Exponentiell wachsende p53^{wt} und p53^{-/-} bzw. siRNA (p53siRNA 10 nM, KsiRNA 10 nM) transfizierte HCT116-Zellen wurden mit 1 Gy bestrahlt und nach 0,5 h, 2 h, 4 h, 6 h und 8 h geerntet. Der Aufschluss der Zellen erfolgte mittels Lysepuffer und Ultraschall.

(A-E) Western-Blot-Analyse. 100 µg Gesamtprotein wurden über SDS-Page elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und mit spezifischen Antikörpern gegen p-cdc25C (Ser216), Plk1 und GAPDH inkubiert. Die Detektion der Banden erfolgte über ein Chemilumineszenz-Kit. Dargestellt ist ein repräsentativer Blot aus 3 Experimenten. In (B) wurde das Zelllysate vor dem Auftrennen zum Entfernen der Phosphorylierungen 30 min bei 37 °C mit 1 U alkalischer Phosphatase behandelt.

(F) cdc25C-Aktivitätstest. cdc25C wurde aus 1,5 mg Gesamtzelllysate mit einem spezifischen cdc25C-NT Antikörper immunpräzipitiert. Die Aktivität des angereicherten cdc25C wurde über den Umsatz des nicht fluoreszierenden Fluoresceindiphosphat in das fluoreszierende Fluorescein pro Minute am Fluoreszenz-Reader gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert aus 2 Experimenten. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte.

Da ein Übergang von der G2-Phase in die Mitose von der Aktivität der Phosphatase Cdc25C abhängig ist, wurde in einem weiteren Versuch die enzymatische Aktivität des Cdc25C in Abhängigkeit vom p53-Status untersucht. p53^{wt} und p53-defiziente HCT116-Zellen wurden mit 1 Gy bestrahlt und zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet.

tet. Nach Aufschluss der Zellen wurde die Gesamtproteinmenge an Cdc25C in den einzelnen Zelllysaten durch Immunpräzipitation angereichert. Die Phosphataseaktivität des Cdc25C konnte anschließend durch den Umsatz des farblosen Substrates Fluoresceindiphosphat bestimmt werden. Durch Messung der Extinktionsänderung nach Bildung des fluoreszierenden Produktes Fluorescein in einem definierten Zeitrahmen wurde die Enzymaktivität des Cdc25C pro Minute bestimmt. In unbehandelten, exponentiell wachsenden Zellen konnte bereits ein Unterschied in der Cdc25C-Aktivität abhängig vom p53-Status beobachtet werden. So zeigt sich eine annähernd doppelte Aktivität in p53wt Zellen im Vergleich zu p53^{-/-} Zellen. Abgesehen von der Ausgangsaktivität sinkt die Cdc25C-Aktivität innerhalb der ersten Stunde nach einer Strahlendosis von 1 Gy unabhängig vom p53-Status auf ein gleiches Niveau ab (Abb. 4.5. E). Die Abnahme der Cdc25C-Aktivität infolge der strahleninduzierten DNA-Schäden korreliert mit dem beobachteten Einsetzen des G2/M-Checkpoints. Während die Cdc25C-Aktivität in p53^{-/-} Zellen nach Bestrahlung auf einem konstanten Level verbleibt, nimmt die Cdc25C-Aktivität in p53wt Zellen 2 h nach einer Strahlendosis von 1 Gy wieder deutlich zu (Abb. 4.5. F), was mit dem Wiedereintritt in den Zellzyklus einhergeht.

Zusammenfassend bestätigen die Untersuchungen auf Ebene der Phosphorylierung von Cdc25C sowie der Aktivitätsnachweis des Cdc25C die Beobachtungen der durchflusszytometrischen Analysen. p53 hat keinen Einfluss auf das Einsetzen des G2/M-Checkpoints nach Applikation einer Strahlendosis von 1 Gy. Es kann jedoch eine Funktion von p53 bei der Aufhebung des G2/M-Checkpoints angenommen werden.

4.1.5. Weiterführende Untersuchung zur Aufhebung des G2/M-Checkpoints in p53^{-/-} Zellen

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass p53 eine Rolle beim Aufheben des G2/M-Checkpoints nach einer Strahlendosis von 1 Gy hat. Es stellte sich die Frage, ob Zellen ohne p53, in denen der G2/M-Checkpoint bereits eingesetzt hat, überhaupt in der Lage sind, durch Unterbrechung des DNA-Schaden-abhängigen Checkpointsignals wieder in den Zellzyklus einzutreten. Zu den ersten Kinasen, die aufgrund eines DNA-Schadens aktiviert werden, zählen die Checkpointkinasen Chk1/Chk2. Ausgehend von diesen Kinasen startet eine Phosphorylierungskaskade, die dafür sorgt, dass die Zellen am G2/M-Checkpoint anhalten (Dasika et al. 1999, Reinhardt und

Yaffe 2009). In diesem Versuch wurde das DNA-Schaden-induzierte Checkpoint-signal 4 h nach Bestrahlung mit 1 Gy durch Inhibition von Chk1/Chk2 mit SB218078 unterbrochen. Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten fixiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung des mitotischen Index anhand des DNA-Gehalts und der spezifischen pH3-Färbung, wie unter 4.1.1. beschrieben. Die Inhibition der Checkpointkinasen führt in p53wt Zellen zu einer zusätzlichen Steigerung des mitotischen Index im Vergleich zum Wiedereintritt in den Zellzyklus unbehandelter p53wt Zellen (Abb. 4.6. A). Die p53-/- Zellen sind ebenfalls nach Inhibition von Chk1/Chk2 in der Lage, ihren Arrest aufzuheben und aus der G2-Phase in die Mitose überzugehen, was einen vergleichbaren Anstieg des mitotischen Index mit dem von inhibierten p53wt Zellen zur Folge hat (Abb. 4.6. B).

Der gesteigerte Wiedereintritt in den Zellzyklus nach Unterbrechung des DNA-Schaden-induzierten Checkpointsignals sollte neben der Analyse von mitotischen Zellen auch auf Ebene von Proteinen, die am G2/M-Checkpoint beteiligt sind, erfolgen. In p53-/- Zellen nimmt die Proteinmenge an p-Cdc25C (Ser216) nach Inhibition von Chk1/Chk2 ab, während die Phosphorylierung von Cdc25C beim anhaltenden G2-Arrest in nicht inhibierten p53-/- Zellen ansteigt. In p53wt-Zellen ist durch das Unterbinden des DNA-Schaden-induzierten Checkpointsignals ein deutlicherer Abfall der Phosphorylierung von Cdc25C am Serin 216 im Vergleich zu unbehandelten Zellen zu beobachten (Abb. 4.6. C). Der Nachweis der inaktiven Form des p-Cdc25C (Ser216) bestätigt den gesteigerten Wiedereintritt in die Mitose in p53wt und p53-/- Zellen nach Inhibierung von Chk1/Chk2.

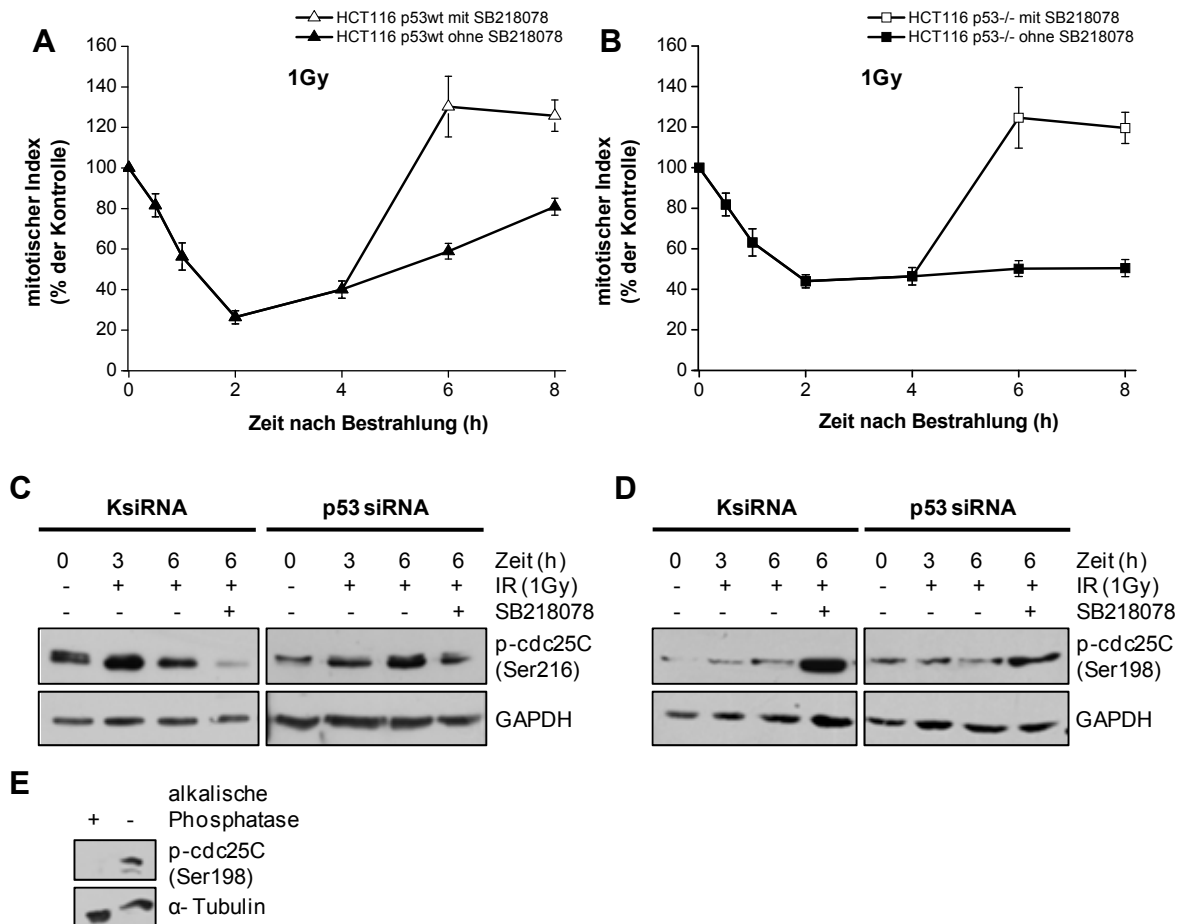


Abb. 4.6. Einfluss von Chk1/Chk2-Inhibitor auf den G2/M-Checkpoint exponentiell wachsender humaner Tumorzellen mit unterschiedlichem p53-Status

(A-B) Durchflusszytometrische Analyse von humanen Tumorzellen (HCT116) mit unterschiedlichem p53-Status. Exponentiell wachsende p53wt und p53-/- HCT116-Zellen wurden mit 1 Gy bestrahlt und anschließend für 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h und 8 h kultiviert. Einige Ansätze wurden 4 h nach Bestrahlung zusätzlich mit einem Chk1/Chk2-Inhibitor (SB218078) behandelt. Nach erfolgter Fixierung wurden die mitotischen Zellen spezifisch mit einem Antikörper gegen pH3 (Ser10) und der DNA-Gehalt unspezifisch mit PI gefärbt. Als Kontrolle wurden unbestrahlte Zellen identisch behandelt. Nach Bestimmung des Anteils der mitotischen Zellen an der Gesamtpopulation erfolgte die Normierung der mitotischen Zellen zu jedem Zeitpunkt auf den mitotischen Index der unbestrahlten Kontrolle. Gezeigt ist der Mittelwert aus 3 Experimenten. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler zwischen den Experimenten dar.

(C-E) Western-Blot-Analyse. 48 h nach siRNA Transfektion (KsiRNA 10 nM, p53siRNA 10 nM) wurden die HCT116-Zellen mit 1 Gy bestrahlt und zu verschiedenen Zeitpunkten (3 h, 6 h) geerntet. Einige Ansätze wurden 4 h nach Bestrahlung mit einem Chk1/Chk2-Inhibitor behandelt. Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch Lysepuffer und Ultraschallbehandlung. 100 µg Gesamtprotein wurden über SDS-Page elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und mit spezifischen Antikörpern gegen p-cdc25C (Ser216), p-cdc25C (Ser198) und GAPDH inkubiert. Die Detektion der Banden erfolgte über ein Chemilumineszenz-Kit. In **(E)** wurde das Zelllysats vor dem Auftrennen zum Entfernen der Phosphorylierungen 30 min bei 37 °C mit 1 U alkalischer Phosphatase behandelt.

Der Übergang in die Mitose sollte weiterhin über eine Form des Cdc25C, die für den Transport zurück in den Zellkern benötigt wird, untersucht werden. Hierzu erfolgt eine Phosphorylierung des Cdc25Cs am Serin 198. Im Fall des p-Cdc25C (Ser198) Antikörpers wurde, wie unter 4.1.4. beschrieben, ein Test zur Spezifität des Antikörpers

durchgeführt. Wie in Abb. 4.6. E gezeigt wird, nimmt die Menge des phosphorylierten Cdc25C (Ser198) nach Behandlung mit alkalischer Phosphatase ab. Der Antikörper erkennt somit nicht die Gesamtmenge an Cdc25C sondern nur die phosphorylierte Form. Zellen mit p53wt zeigen 3 h nach Bestrahlung einen Anstieg in der Phosphorylierung von Cdc25C am Serin 198 (Abb. 4.6. D). Diese Zunahme korreliert mit dem Anstieg, der für die Phosphorylierung verantwortlichen Plk1 in Abb. 4.5. D. Die Inhibition der Chk1/Chk2 führt noch einmal zu einer deutlichen Steigerung der p-Cdc25C (Ser198) Proteinmenge. (Abb. 4.6. D). Dieser Anstieg stimmt aufgrund der aktivierenden Funktion des p-Cdc25C (Ser198) für den Übergang von G2 in die Mitose mit dem Anstieg des mitotischen Index überein (Abb. 4.6. A). In p53^{-/-} Zellen bleibt die Proteinmenge von p-Cdc25C (Ser198) nach Bestrahlung mit 1 Gy unverändert (Abb. 4.6. D). Diese Beobachtung ist konsistent mit der gleichbleibenden Menge an Plk1 (Abb. 4.5. D) und dem anhaltenden G2-Arrest. Erst durch Inhibition der Chk1/Chk2 konnte eine deutliche Zunahme der Phosphorylierung am Serin 198 beobachtet werden (Abb. 4.6. D). Dieser Anstieg war aufgrund des Übergangs aus G2 in die Mitose nach Inhibition der Chk1/Chk2 zu erwarten.

Die Untersuchungen nach Unterbinden des DNA-Schaden-induzierten Checkpoint-signals verdeutlichen, dass Zellen ohne p53 in der Lage sind nach Einsetzen des G2/M-Checkpoints in die Mitose überzugehen.

4.2. Funktion von p53 bei der Reparatur in der G2-Phase

Zusammenfassend machen die Ergebnisse zur Untersuchung des G2/M-Checkpoints abhängig vom p53-Status deutlich, dass p53 neben den bekannten Funktionen am G1/S-Checkpoint (Kuerbitz et al. 1998, Kastan et al. 1998) auch für das Aufheben des G2/M-Checkpoints nach einer Strahlendosis von 1 Gy von Bedeutung ist. So bleiben p53-defiziente Zellen nach Bestrahlung in der G2-Phase arretiert, während p53wt-Zellen nach einiger Zeit in die Mitose übergehen.

In einigen Studien konnte ein Zusammenspiel von Checkpoint-Kontrolle und DNA-Reparatur aufgezeigt werden. So führt ein Defekt in der Reparatur zu einem verlängerten G2-Arrest. Dies wurde in Zellen beobachtet, in denen die DNA-PK inhibiert wurde. Die DNA-PK spielt eine entscheidende Rolle bei der DNA-Reparatur via NHEJ. Somit kann darauf geschlossen werden, dass der Reparaturdefekt zu einem verlängerten G2-Arrest führt (Sturgeon et al. 2006, Arlander et al. 2008).

Aufgrund des engen Zusammenhangs von Checkpoint-Kontrolle und Reparatur des entstandenen DNA-Schadens soll in dem nachfolgenden Teil der Arbeit geklärt werden, ob der verlängerte G2-Arrest in p53-defizienten Zellen auf einen Defekt in der Reparatur in der G2-Phase zurückzuführen sein könnte. Bevor jedoch das Reparaturverhalten in p53-/- Zellen geprüft werden konnte, mussten die verwendeten Methoden an bekannten Reparaturproteinen überprüft werden.

4.2.1. Anwendung der γ H2AX-Analyse zur Charakterisierung der DNA-Reparatur in exponentiell wachsenden humanen Zellen

Nach Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) durch Behandlung der Zellen mit ionisierender Strahlung (IR) kann die Reparaturfähigkeit der Zellen anhand der Bildung und des Abbaus von γ H2AX-Foci untersucht werden. Nach dem Auftreten eines DSB wird das Histon H2AX sehr schnell durch ATM bzw. in dessen Abwesenheit von DNA-PK am Serin 139 phosphoryliert (Stiff et al. 2004). Da die Phosphorylierung des H2AX (γ H2AX) über eine lange Distanz (Mbp) vom DSB aus erfolgt und das γ H2AX durch spezifische Antikörper nachgewiesen werden kann, können DSBs als diskrete Foci visualisiert werden (Löbrich et al. 2010). Bei der Reparatur-Analyse exponentiell wachsender humaner Zellen muss der Übertritt zwischen den einzelnen Zellzyklusphasen während der Reparaturzeit verhindert werden, um eine Verfälschung der Ergebnisse ausschließen zu können. Der Einsatz des Polymerase-Inhibitors Aphidicolin unterbindet den Übergang von der S- in die G2-Phase und der Einsatz des Spindelgiftes Nocodazol den Übergang von der G2- in die G1-Phase. Die Identifizierung der einzelnen Zellzyklusphasen erfolgt aufgrund des DNA-Gehalts, bei der das γ H2AX-Signal gegen die DAPI-Intensität aufgetragen wird, wodurch bei 5000 ausgewählten Zellen eine hufeisenförmige Verteilung entsteht. Diese Verteilung spiegelt die einzelnen Zellzyklusphasen wider (Abb. 4.7. A). Zellen mit einem einfachen DNA-Gehalt und einer relativ geringen γ H2AX-Intensität stellen die G1-Zellen da, wogegen die G2-Zellen einen doppelten DNA-Gehalt aber ebenfalls ein geringes γ H2AX-Signal aufzeigen. Zellen in der S-Phase, die einen DNA-Gehalt zwischen den G1- und G2-Zellen besitzen, können aufgrund des flächigen γ H2AX-Signals infolge der Aphidicolinbehandlung ausgeschlossen werden. Die Behandlung mit Aphidicolin führt zu einem Replikationsarrest, der das Einsetzen einer DNA-Schadensantwort zur Folge hat. H2AX wird in einem so starken Ausmaß phosphoryliert, dass S-Phase-Zellen eine pan-nukleäre γ H2AX-Färbung aufweisen.

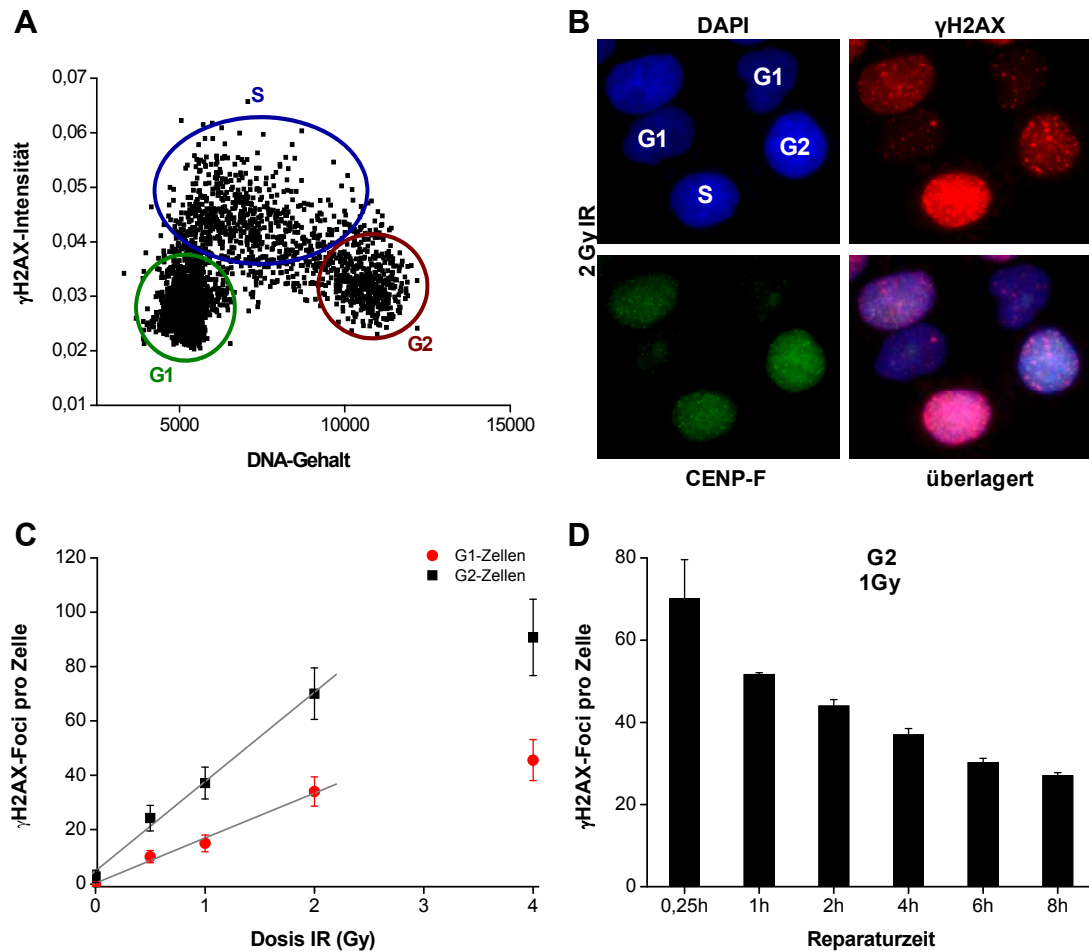


Abb. 4.7. Identifizierung der Zellzyklusphasen in exponentiell wachsenden humanen Tumorzellen

HeLa-S3-Zellen wurden bestrahlt und mit Aphidicolin versetzt. Nach Ablauf der Reparaturzeit (0,25 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h) wurden die Zellen fixiert und eine Immunfluoreszenzfärbung gegen γ H2AX und CENP-F durchgeführt. Zudem wurden unbestrahlte Kontrollzellen mit Aphidicolin versetzt und einer identischen Behandlung unterzogen.

(A) Dotplot zur Überprüfung der beschriebenen Identifikationskriterien zur Bestimmung der Zellzyklusphasen. Dargestellt ist die γ H2AX-Intensität (Y-Achse, dimensionslos) gegen den anhand der DAPI-Intensität ermittelten DNA-Gehalt (X-Achse, dimensionslos) von 5000 gefärbten Zellen.

(B) Immunfluoreszenzfärbung von bestrahlten humanen Tumorzellen 2 h nach Bestrahlung mit 2 Gy mit Antikörpern gegen γ H2AX (rot) und CENP-F (grün), aufgenommen bei 630facher Vergrößerung. Die DNA wurde unspezifisch mit DAPI (blau) gegengefärbt. G2-Zellen zeigen ein intensives pan-nukleäres CENP-F-Signal bei punktförmigem γ H2AX-Muster. S-Zellen zeigen ebenfalls ein flächiges, aber weniger intensives CENP-F Signal und ein aufgrund der Behandlung mit Aphidicolin pan-nukleäres γ H2AX-Signal. G1-Zellen sind CENP-F negativ und zeigen ein punktförmiges γ H2AX-Signal. Weiterhin gibt es Zellen, die nicht genau zugeordnet werden können. Diese werden aus der Auswertung ausgeschlossen.

(C) Induktionskurve von γ H2AX-Foci. HeLa-S3-Zellen wurden mit unterschiedlichen Dosen (0,5, 1, 2 und 4 Gy) bestrahlt und 15 min kultiviert. Die Quantifizierung der γ H2AX-Foci erfolgte in den G1- und G2-Zellen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von 40 G1- bzw. G2-Zellen.

(D) γ H2AX-Kinetik bestrahlter humaner Tumorzellen. Die Kontrollwerte von 3,6–5,6 wurden abgezogen. Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 Experimenten. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte.

Zur Kontrolle der Auswertung mittels DNA-Gehalt und γ H2AX-Signal wurden die Zellen zusätzlich mit einem spezifischen Antikörper gegen CENP-F (Centromer-Protein F) gefärbt. CENP-F wird in der späten S- und G2-Phase exprimiert und ist als pan-nukleäre Kernfärbung im Immunfluoreszenzansatz sichtbar. G1-Zellen sind CENP-F negativ, während G2-Zellen ein intensives CENP-F-Signal aufweisen (Abb. 4.7. B). Diese Unterschiede erlauben die Identifizierung der Zellzyklusphasen und ermöglichen die gezielte Auswertung einer Zellpopulation in der G1- bzw. der G2-Phase.

Die Überprüfung der Linearität zwischen applizierter Dosis und auftretenden DSBs in der G2-Phase erfolgte in dem für die nachfolgenden Untersuchungen relevanten Dosisbereich von 0-4 Gy Röntgenstrahlung. Die Anzahl der induzierten γ H2AX-Foci steigt linear mit der Dosis zwischen 0 und 2 Gy in den G1- und G2-Zellen an. Dabei ist zu beobachten, dass die G2-Zellen aufgrund des doppelten DNA-Gehalts doppelt so viele Foci wie die G1-Zellen aufweisen. Bei Dosen über 2 Gy ist keine Linearität mehr gegeben, da man ab etwa 80 Foci in G2-Zellen eine Sättigung erreicht. In G1-Zellen wird eine Sättigung aufgrund der Zellgröße schon vorher erreicht (Abb. 4.7. C). Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Unterscheidung der Foci aufgrund des hohen Schadensniveaus nicht mehr eindeutig erfolgen kann. Es konnte gezeigt werden, dass die hier verwendete Dosis von 2 Gy sowohl in der G1- als auch in der G2-Phase im linearen Bereich induziert und somit eine quantitative Analyse der DSB-Reparatur anhand der Analyse von γ H2AX-Foci ermöglicht wird.

Zur Untersuchung des Reparaturverhaltens in den einzelnen Zellzyklusphasen musste eine Reparaturkinetik aufgenommen werden. Dazu wurden HeLa-S3-Zellen mit 2 Gy bestrahlt, zu unterschiedlichen Zeiten fixiert und mit spezifischen Antikörpern gegen γ H2AX (Ser139) gefärbt. Anschließend wurde die Anzahl der γ H2AX-Foci in den G2-Zellen bestimmt. Nach einer Strahlendosis von 2 Gy werden ca. 70 Foci in den Zellen induziert. Innerhalb von 8 h ist die Zelle in der Lage, ca. 60 % der induzierten Brüche zu reparieren (Abb. 4.7. D), während in primären Fibroblasten nach 8 h 75 % der DSBs repariert werden (Beucher et al. 2009). Die Reparatur zeigt dabei einen charakteristischen Verlauf der innerhalb der ersten 2 h Stunden durch eine schnelle Reparatur der DSBs und zu späteren Zeitpunkten durch eine langsame Reparatur gekennzeichnet ist. So verbleiben nach den ersten 2 h von den 70 initialen Foci noch 45 Foci unrepariert, deren Anzahl in den verbleibenden 6 h Reparaturzeit noch auf 30 sinkt (Abb. 4.7. D).

4.2.2. Untersuchung des Einflusses verschiedener Proteine auf die Doppelstrangbruch-Reparatur mittels γ H2AX-Foci-Analyse

Zur Überprüfung der Eignung der γ H2AX-Foci-Analyse für die Untersuchung des Reparaturverhaltens von Zellen mit unterschiedlichem p53-Status wurde die γ H2AX-Foci-Analyse zunächst an bekannten Reparaturproteinen durchgeführt. Die Reparatur von DSBs, hervorgerufen durch ionisierende Strahlung, kann über zwei verschiedene Wege erfolgen, das nicht-homologe End-Joining (NHEJ) oder die homologe Rekombination (HR). Ein für das NHEJ wichtiges Protein ist Ku80, das beim initialen Schritt der DSB-Erkennung beteiligt ist (Weterings und Chen 2008). Brca2 und Rad51 sind dagegen Proteine, die in der HR von großer Bedeutung sind (Fillipo et al. 2008).

Zur Untersuchung dieser beiden Reparaturwege mittels γ H2AX-Foci-Analyse wurden die bekannten Reparaturproteine Brca2, Ku80 und Rad51 in HeLa-S3-Zellen mit siRNA herunterreguliert. Die siRNA-transfizierten Zellen werden im Nachfolgenden als depletiert bezeichnet. Die Überprüfung des Ausschaltens der Gene und damit verbunden die Herunterregulation der Proteine erfolgte über den Nachweis mittels Western-Blot. Die Zellen, die mit spezifischer siRNA transfiziert wurden, zeigen im Vergleich zu den Kontrollzellen eine Verminderung bzw. ein Verschwinden der Menge an Zielprotein (Abb. 4.8. A). 48 h nach der Transfektion wurden DNA-Schäden durch eine Strahlendosis von 2 Gy induziert. Nach Ablauf der Reparaturzeiten wurden die Zellen geerntet und die Immunfluoreszenzfärbung von γ H2AX durchgeführt. Bei den Untersuchungen der γ H2AX-Foci-Kinetik von Zellen mit einer Herunterregulation von Brca2, Ku80 und Rad51 wurde die Induktion der γ H2AX-Foci nicht ausgewertet, da in unserer Arbeitsgruppe mehrfach gezeigt werden konnte, dass der Verlust dieser Proteine keinen Einfluss auf die Induktion der DSBs hat. Im Fall der HeLa-S3-Zelllinie werden bei 2 Gy ca. 70 Foci in der G2- und ca. 34 Foci in der G1-Zelle induziert (Abb. 4.7. D). Das Reparaturverhalten der mit siRNA-transfizierten Zellen unterscheidet sich vom Verhalten der Kontrollzellen. In einer Ku80-depletierten Zelllinie ist bereits nach 2 h ein Unterschied in den G2-Zellen im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten. Dieser Unterschied zeigt sich in einer verminderten Reparaturkapazität und nimmt im Laufe der Reparaturzeit deutlich zu. Nach 2 h haben die Kontrollzellen ca. 9 Foci weniger, d.h. es wurden 9 DSBs mehr repariert. Nach 10 h beträgt dieser Unterschied bereits 21 Foci (Abb. 4.8. B). In den G1-Zellen ist ein ähnliches Reparaturverhalten zu beobachten. 2 h nach Bestrahlung tritt bereits

ein kleiner Unterschied von 3 Foci auf, der nach 10 h auf 8 Foci Unterschied zu Kontrollzellen ansteigt (Abb. 4.8. C). Das frühe Auftreten eines Unterschiedes in der Reparatur der DSBs deutet auf einen Defekt in der schnellen Komponente der Reparatur in G1 und G2 hin. Der Anstieg des Reparaturdefektes zu späteren Zeiten deutet an, dass in den HeLa-S3-Zellen auch ein Defekt in der langsamen Komponente der Reparatur durch Depletion von Ku80 ausgelöst wird. Die schnelle Reparatur innerhalb der ersten Stunden in G1 und G2 stellt das NHEJ dar.

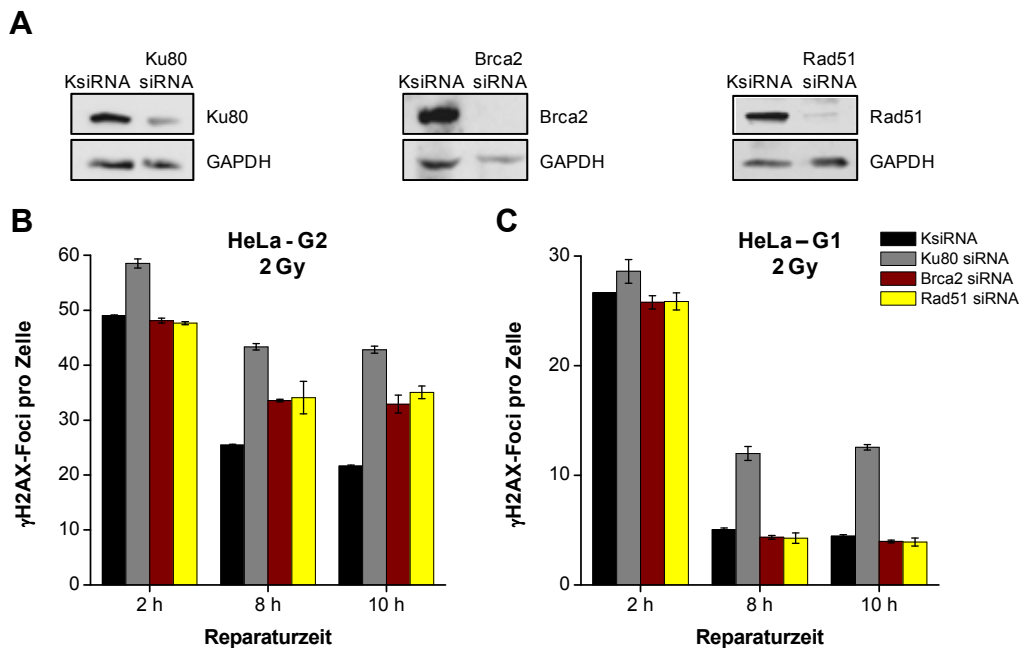


Abb. 4.8. Einfluss verschiedener Proteine auf die DNA-Reparatur in exponentiell wachsenden humanen Tumorzellen

(A) Western-Blot-Analyse zum Nachweis der erfolgreichen siRNA-Transfektion (Brca2 siRNA 25 nM, KsiRNA 20 nM, Ku80 siRNA 15 nM, Rad51 siRNA 10 nM). 48 h nach Transfektion der siRNA wurden die Zellen geerntet und durch Lysepuffer und Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. 50-200 µg Gesamtprotein wurden über SDS-Page elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und mit spezifischen Antikörpern gegen Brca2, Ku80, Rad51 und GAPDH inkubiert. Die Detektion der Banden erfolgte über ein Chemilumineszenz-Kit. Dargestellt ist ein repräsentativer Blot aus 3 Experimenten.

(B-C) γH2AX-Foci-Analyse. 48 h nach der Transfektion verschiedener siRNAs wurden HeLa-S3-Zellen mit 2 Gy bestrahlt und nach Ablauf der Reparaturzeit (2 h, 8 h und 10 h) fixiert. Nach der Fixierung wurde die Immunfluoreszenzfärbung von γH2AX durchgeführt. Als Kontrolle wurden unbestrahlte Zellen mitgeführt und identisch behandelt. Die Quantifizierung der γH2AX-Foci erfolgte in G1- und G2-Zellen. Die Kontrollwerte von 0,3-0,6 (G1) und 3,2-6,5 (G2) wurden abgezogen. Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 Experimenten. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte.

Die Brca2- und Rad51-depletierten Zellen weisen sowohl in der G1- als auch in der G2-Phase ein mit Kontrollzellen vergleichbares Reparaturverhalten zu den frühen Zeitpunkten und somit in der schnellen Reparaturkomponente auf. Ein Reparaturdefekt wird nur in der langsamen Reparaturkomponente der G2-Phase beobachtet. Hier ist zu den späteren Zeitpunkten (8 h, 10 h) ein erhöhtes Foci-Niveau von ca. 10 Foci

erkennbar (Abb. 4.8. B). Diese unreparierten DSBs machen etwa 15 % der initial vorhandenen DSBs aus. Da das Reparaturverhalten in G1 mit dem von Kontrollzellen vergleichbar ist, scheinen Brca2 und Rad51 nur in der langsamen Komponente der Reparatur in G2 notwendig zu sein. In der G2-Phase stellt die langsame Reparatur demnach die HR dar. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die γ H2AX-Foci-Analyse erste Hinweise auf eine Funktion von Proteinen im NHEJ bzw. HR liefern kann. So zeigen NHEJ-Mutanten bereits einen Defekt in der schnellen Reparaturkomponente, während HR-Mutanten erst in der langsamen Komponente DSBs unrepariert belassen.

Die Methode eignet sich zur Klärung der Frage, ob p53 eine Rolle im NHEJ bzw. HR spielt und somit für das Aufheben des G2-Arrests verantwortlich ist. Dazu wurden p53wt und p53^{-/-} HCT116-Zellen sowie p53siRNA-transfizierte HeLa-S3-Zellen mit 2 Gy bestrahlt, nach verschiedenen Reparaturzeiten fixiert und gegen γ H2AX gefärbt. Die Auswertung der γ H2AX-Foci erfolgte in den G1- sowie den G2-Zellen. Der Unterschied in der Induktion der strahleninduzierten DSBs in der G2-Phase zwischen p53-defizienten und Kontrollzellen beträgt 4-5 Foci. Dies gilt sowohl für die HCT116- als auch für die HeLa-S3-Zelllinie. Allerdings konnte beobachtet werden, dass sich in G2-Zellen die Gesamtanzahl der induzierten DSBs beider Zelllinien um ca. 20 Foci unterscheidet. In beiden Zelllinien verbleiben jedoch unabhängig vom p53-Status 8 h nach Bestrahlung in der G2-Phase noch ca. 50 % der induzierten DSBs. Das erhöhte γ H2AX-Foci-Niveau in p53^{-/-} Zellen beträgt zu allen Reparaturzeitpunkten konstant 4-5 Foci (Abb. 4.9. A, C). Die Reparatur in G1-Zellen weist ein ähnliches Verhalten auf. Die Induktion der DSBs ist in p53^{-/-} Zellen um ca. 2 Foci höher. Dieser Unterschied ist über den gesamten Reparaturzeitraum zu beobachten. Die 27-29 induzierten γ H2AX-Foci werden auf 5-7 Foci repariert, d.h. ca. 20 % der DSBs verbleiben nach 8 h unrepariert.

Weder in der G1- noch in der G2-Phase zeigen p53^{-/-} Zellen einen mit einer NHEJ-Mutante (Ku80) vergleichbaren Defekt in der Reparatur der schnellen Komponente. Somit kann eine Rolle von p53 im NHEJ ausgeschlossen werden. Auch eine Reparaturkinetik, die mit der von HR-Mutanten (Brca2, Rad51) vergleichbar ist, konnte nicht beobachtet werden. Eine eindeutige Funktion von p53 in der HR kann daher nicht angenommen werden. Da für p53 aufgrund der Interaktion mit Rad51 jedoch eine Funktion in der HR beschrieben wurde (Stürzbecher et al. 1996), sollte im folgenden die HR noch einmal genauer untersucht werden.

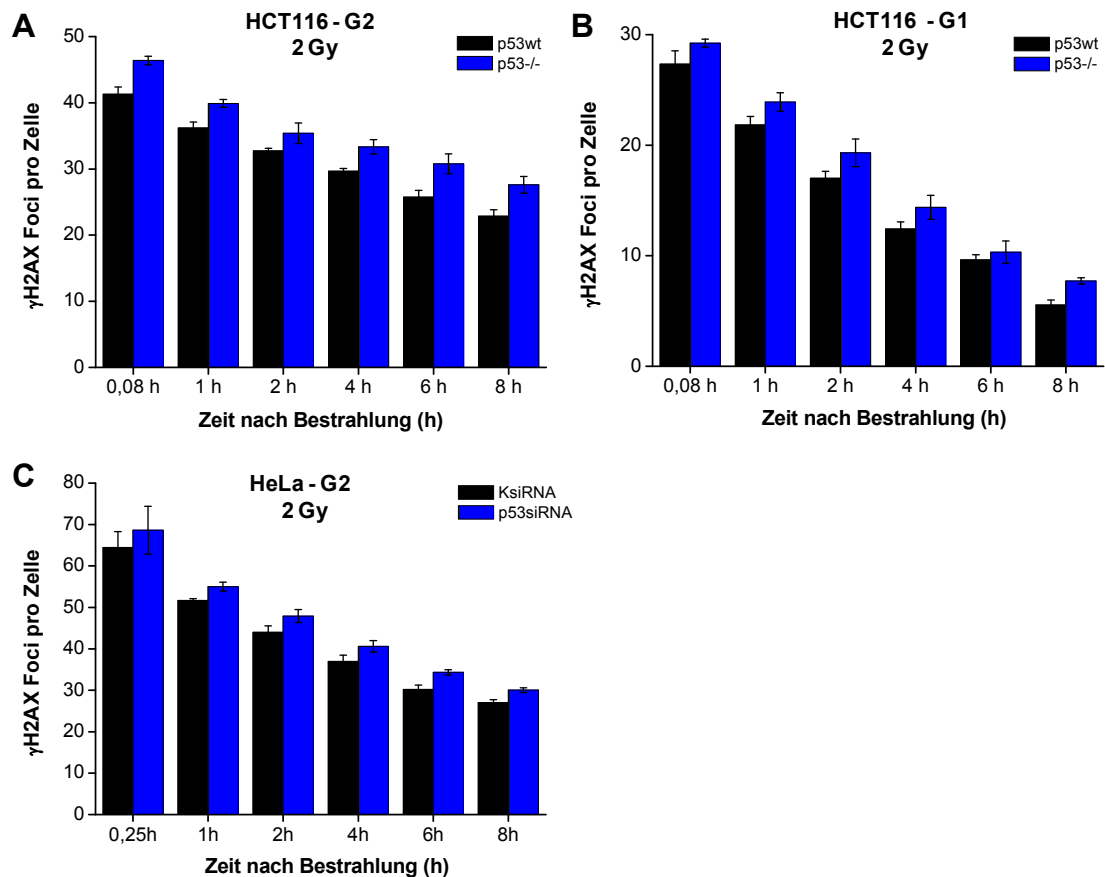


Abb. 4.9. Einfluss des p53-Status auf die DSB-Reparatur exponentiell wachsender humaner Tumorzellen

(A-C) γ H2AX-Foci-Analyse von p53-defizienten Zellen. p53wt und p53-/- HCT116Zellen (A,B) und p53siRNA (10 nM) transfizierte HeLa-S3-Zellen (C) wurden bestrahlt (2 Gy), mit Aphidicolin versetzt und nach Ablauf der Reparaturzeit (0,25 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8h) fixiert. Zudem wurden unbestrahlte Kontrollzellen mit Aphidicolin versetzt und einer identischen Behandlung unterzogen. Nach erfolgter Immunfluoreszenzfärbung wurden die γ H2AX-Foci in den G1- und G2-Zellen quantifiziert und die Kontrollwerte von 0,8-1,3 (G1, HCT116), 2,4-3,2 (G2, HCT116) und 3,6-5,6 (HeLa) abgezogen. Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 Experimenten. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte.

4.2.3. Anwendung der Rad51-Foci-Analyse zur Charakterisierung der HR in G2-Zellen

Bei der langsamen Komponente der Reparatur in der G2-Phase handelt es sich um die homologe Rekombination (HR), was bei der Untersuchung von Brca2- und Rad51-depletierten Zellen durch γ H2AX-Foci-Analyse gezeigt werden konnte. Ein wichtiger Schritt für die Initiation der HR ist die Resektion der DSBs. Hierbei kommt es zur Entstehung von einzelsträngigen DNA-Bereichen (ssDNA), die durch Beladung mit Rad51 auf die HR vorbereitet werden. Die Anlagerung von Rad51 an die ssDNA kann durch spezifische Antikörper als Fokus in der Zelle sichtbar gemacht

werden (Haaf et al. 1995, Baumann and West 1998, Satori et al. 2007). Die Rad51-Foci-Analyse stellt somit einen indirekten Nachweis für die HR dar.

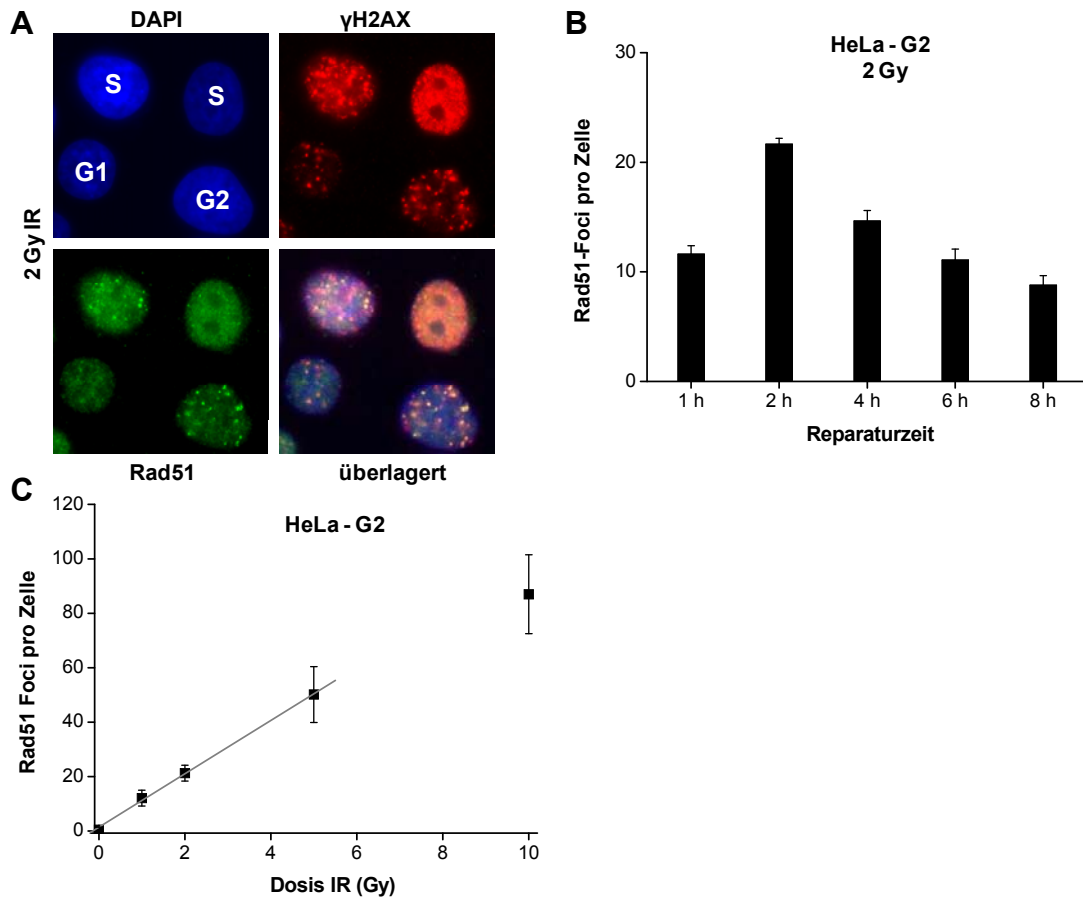


Abb. 4.10. Rad51-Foci als Marker für die Resektion der DSBs

(A) Immunfluoreszenzfärbung von bestrahlten HeLa-S3-Zellen (2 Gy + Aphidicolin 2 h Reparaturzeit) mit Antikörpern gegen γH2AX (rot) und Rad51 (grün), aufgenommen bei 630facher Vergrößerung. Die DNA wurde unspezifisch mit DAPI (blau) gegengefärbt.

(B) Rad51-Foci-Kinetik bestrahlter HeLa-S3-Zellen (2 Gy + Aphidicolin). Nach Ablauf der Reparaturzeit (1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8h) wurden die Zellen fixiert und gegen γH2AX und Rad51 gefärbt. Zudem wurden unbestrahlte Kontrollzellen mit Aphidicolin versetzt und einer identischen Behandlung unterzogen. Die Quantifizierung der Rad51-Foci erfolgte in den G2-Zellen. Die Kontrollwerte von 1,3-1,5 wurden abgezogen. Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 Experimenten. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte.

(C) Rad51-Foci in Abhängigkeit von der Dosis. HeLa-S3-Zellen wurden mit unterschiedlichen Dosen (0, 1, 2, 5 und 10 Gy) bestrahlt und 2 h kultiviert. Nach der Fixierung wurde die Immunfluoreszenzfärbung von γH2AX und Rad51 durchgeführt. Die Quantifizierung der Rad51-Foci erfolgte in den G2-Zellen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von 40 G2-Zellen.

Zum Nachweis von Rad51-Foci wurden HeLa-S3-Zellen mit einer Strahlendosis von 2 Gy bestrahlt, nach Ablauf der Reparaturzeit fixiert und spezifisch gegen Rad51 und γH2AX gefärbt. Die Analyse der Zellzyklusphasen erfolgte, wie unter 4.2.1. beschrieben. Bestätigend zum Ablauf der HR in der S- und G2-Phase konnte gezeigt werden, dass Rad51-Foci nur in diesen beiden Zellzyklusphasen auftreten, wogegen die G1-Zellen negativ für Rad51-Foci sind (Abb. 4.10. A). Der kinetische Verlauf der Rad51-

Foci unterscheidet sich vom typischen Verlauf einer γ H2AX-Foci-Kinetik, bei der zum Zeitpunkt der Induktion das Maximum an γ H2AX-Foci auftritt. Die Ausbildung der Rad51-Foci erreicht erst 2 h nach Bestrahlung ein Maximum von ca. 21 Foci. Nach dem Erreichen des Maximums konnte aber wie bei der γ H2AX-Foci-Kinetik ein Abfall der Rad51-Foci auf ca. 8 beobachtet werden (Abb. 4.10. B). Dieser Abfall lässt vermuten, dass die resektierten DSBs repariert wurden.

Zur Überprüfung der Linearität zwischen der für die folgenden Versuche applizierten Dosis und der auftretenden Rad51-Foci in der G2-Phase wurde die Ausbildung der Rad51-Foci in einem Dosisbereich von 0-10 Gy zum Zeitpunkt des Maximums (2 h) untersucht. Die Anzahl der Rad51-Foci steigt im Bereich 0-5 Gy in G2-Zellen linear an. Bei Dosen über 5 Gy ist keine Linearität mehr gegeben, da ab etwa 80 Foci in G2-Zellen eine Sättigung erreicht ist (siehe Kapitel 4.2.1.). Somit kann gezeigt werden, dass die hier verwendete Dosis von 2 Gy in der G2-Phase im linearen Bereich liegt und daher eine quantitative Analyse der DSB-Resektion und anschließender Reparatur anhand von Rad51-Foci ermöglicht wird (Abb. 4.10. C).

4.2.4. Untersuchung des Einflusses verschiedener Proteine auf die DSB-Resektion und DSB-Reparatur in der G2-Phase mittels Rad51-Foci-Analyse

Bevor der Einfluss von p53 auf die Resektion der DSBs und damit auf die HR überprüft werden kann, sollte die Rad51-Foci-Analyse zunächst an den bekannten NHEJ- und HR-Mutanten etabliert werden. In HeLa-S3-Zellen wurde Brca2, Ku80 und Rad51 durch Transfektion mit spezifischer siRNA ausgeschaltet. Anschließend wurden die Zellen mit 2 Gy bestrahlt, nach Ablauf der Reparaturzeit fixiert und gegen Rad51 und γ H2AX gefärbt. In Rad51-depletierten Zellen können keine Rad51-Foci nachgewiesen werden (Abb. 4.11). Dies kann zum einen als Kontrolle der erfolgreichen siRNA-Transfektion und zum anderen als Kontrolle der Spezifität der Rad51-Foci angesehen werden. Ein Ausbleiben der Ausbildung von Rad51-Foci ist ebenfalls in Brca2-depletierten Zellen zu beobachten (Abb. 4.11.). Dies ist entsprechend der Funktion von Brca2 beim Beladen der ssDNA mit Rad51 zu erwarten gewesen. Im Vergleich zu den HR-Mutanten zeigen Ku80-depletierte Zellen eine normale Ausbildung der Rad51-Foci. Hier kann wie in Kontrollzellen 2 h nach Bestrahlung ein Maximum von ca. 20 Foci beobachtet werden. Auch die Abnahme der Rad51-Foci ist mit den Kontrollzellen vergleichbar (Abb. 4.11.). Somit können in Abwesenheit von Ku80 DSBs resektiert und über HR repariert werden. Die HR-Mutanten zeigen einen

Defekt in der Ausbildung von Rad51-Foci während ein Defekt im NHEJ keinen Einfluss auf die Ausbildung der Rad51-Foci zur Folge hat. Daher eignet sich der Nachweis von Rad51-Foci als eine indirekte Methode zur Messung von HR.

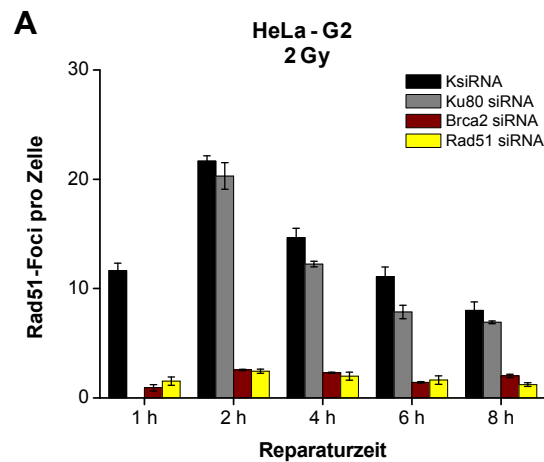


Abb. 4.11. Einfluss verschiedener Proteine auf die DSB-Resektion in der G2-Phase exponentiell wachsender humaner Tumorzellen

(A) Rad51-Foci-Kinetik. 48 h nach Transfektion verschiedener siRNAs (Brca2 siRNA 25 nM, KsiRNA 20 nM, Ku80 siRNA 15 nM, Rad51 siRNA 10 nM) wurden HeLa-S3-Zellen mit 2 Gy bestrahlt und mit Aphidicolin versetzt. Nach Ablauf der Reparaturzeit (2 h, 8 h und 10 h) wurden die Zellen fixiert und die Immunfluoreszenzfärbung von γ H2AX und Rad51 durchgeführt. Die Quantifizierung der Rad51-Foci erfolgte anhand des DAPI- und γ H2AX-Signals in den G2-Zellen. Zudem wurden unbestrahlte Kontrollzellen mit Aphidicolin versetzt und einer identischen Behandlung unterzogen, deren Werte von denen der Reparaturzeitpunkte abgezogen wurden (0,7-2). Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 Experimenten. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte.

Die Rad51-Foci-Analyse konnte zur Untersuchung des Einflusses von p53 auf die HR verwendet werden. Dazu wurden HeLa-S3-Zellen mit KsiRNA bzw. p53siRNA transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen mit 2 Gy bestrahlt, nach Ablauf der Reparaturzeit fixiert, anschließend gegen Rad51 und γ H2AX gefärbt und die Rad51-Foci in den G2-Zellen ausgewertet. Das Ergebnis ist in Abb. 4.12. dargestellt. p53-depletierte Zellen zeigen den typischen Verlauf der Ausbildung und der Abnahme der Rad51-Foci. 2 h nach Bestrahlung wird ein Maximum von ca. 24 Foci erreicht, das innerhalb der nächsten 6 h auf ca. 8 Foci absinkt. Dies zeigt, dass Zellen ohne p53 keinen Defekt in der Reparatur von DSBs über HR besitzen. Auffällig ist jedoch das erhöhte Niveau von 2-4 Rad51-Foci zu allen Reparaturzeitpunkten in p53-depletierten Zellen. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass p53 eine reprimierende Wirkung auf die HR hat. Ein Defekt in der HR kann als mögliche Ursache des verlängerten Arrests in der G2-Phase p53-defizienten Zellen ausgeschlossen werden. Es muss viel mehr angenommen werden, dass in Zellen ohne p53 eine gesteigerte Reparatur der DSBs über die HR erfolgt.

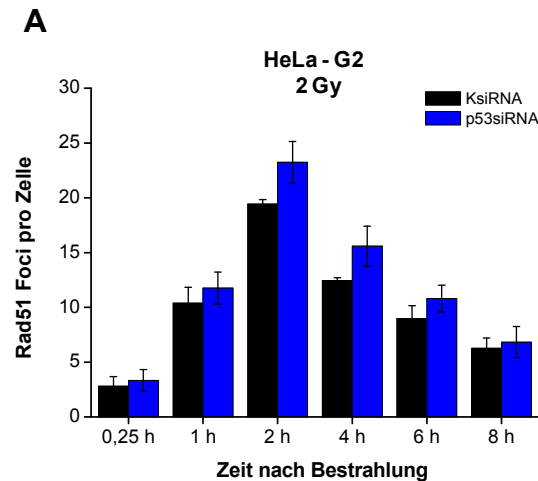


Abb. 4.12. Einfluss des p53-Status auf die DSB-Resektion in der G2-Phase exponentiell wachsender humaner Tumorzellen

(A) Rad51-Foci-Analyse von p53-defizienten Zellen. 48 h nach der Transfektion von KsiRNA bzw. p53siRNA (10 nM) wurden die HeLa-S3-Zellen bestrahlt (2 Gy + Aphidicolin) und nach Ablauf der Reparaturzeit (0,25 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h) fixiert und die Immunfluoreszenzfärbung von γ H2AX und Rad51 durchgeführt. Als Kontrolle wurden unbestrahlte Zellen mitgeführt und deren Werte von denen der Reparaturzeitpunkte abgezogen (1,3-1,5). Die Quantifizierung der Rad51-Foci erfolgte anhand des DAPI- und γ H2AX-Signals in den G2-Zellen. Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 Experimenten. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte.

4.3. Die Rolle von Artemis und ATM in der Reparatur von Strahleninduzierten DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs)

Im nächsten Teil der Arbeit sollte die DSB-Reparatur in Abhängigkeit von ATM und Artemis genauer untersucht werden. Vor einigen Jahren konnten Riballo et al. (2004) für Artemis eine Rolle in der langsamen Reparatur in der G1-Phase nachweisen. Bald darauf wurde für Artemis neben der Rolle in der langsamen Reparatur in G1 auch eine Rolle in der langsamen Reparatur in G2 aufgezeigt (Deckbar et al. 2007). Neueste Studien legen dar, dass sowohl der Artemis- als auch der ATM-abhängige Reparaturdefekt in der G2-Phase mit dem Reparaturdefekt von HR-Mutanten vergleichbar ist. Da die HR-Mutanten in der G1-Phase keinen Defekt in der Reparatur aufweisen, stellt sich interessanterweise die Frage, welche Rolle Artemis und ATM bei der Reparatur in G1 und G2 spielen und vor allem bei welchem Reparaturweg sie von größerer Bedeutung sind. Zur Klärung dieser Fragen wurden die im ersten Teil der Arbeit etablierten Methoden wie siRNA-Transfektion, γ H2AX- und Rad51-Foci-Analyse benützt.

4.3.1. Untersuchung des Einflusses von Artemis und ATM auf die DSB-Reparatur mittels γ H2AX- und Rad51-Foci-Analyse

Zur Untersuchung der Rolle von Artemis und ATM bei der DSB-Reparatur in der G1- und der G2-Phase wurden HeLa-S3-Zellen mit Artemis und ATM spezifischer siRNA transfiziert. Zur Kontrolle einer erfolgreichen Herunterregulation von Artemis und ATM wurde die Proteinmenge im Western-Blot überprüft. Die Zellen, die mit spezifischer siRNA transfiziert wurden, zeigen im Vergleich zu den Kontrollzellen eine Verminderung bzw. ein Verschwinden der Menge des Zielproteins (Abb. 4.13. A). Die transfizierten Zellen wurden mit 2 Gy bestrahlt, nach Ablauf der Reparaturzeit fixiert und mit spezifischen Antikörpern gegen γ H2AX und Rad51 gefärbt.

Übereinstimmend mit den Veröffentlichungen von Riballo et al. (2004) und Deckbar et al. (2007) konnte auch in der vorliegenden Arbeit in ATM- und Artemis-depletierten Zellen ein Reparaturdefekt in der langsamen Komponente beobachtet werden. In der G1- wie auch in der G2-Phase unterscheiden sich Artemis- und ATM-depletierte Zellen 2 h nach Bestrahlung nicht wesentlich vom Wildtyp. Die schnelle Komponente der Reparatur ist demnach nicht beeinträchtigt. Erst zu späteren Zeiten manifestiert sich in Artemis- und ATM-depletierten Zellen ein erhöhtes Niveau an γ H2AX-Foci im Vergleich zu Kontrollzellen. So verbleiben in der G1-Phase ca. 4 Foci und in der G2-Phase ca. 8 Foci mehr als in den Kontrollzellen unrepariert. Entsprechend der Induktionswerte von 34 Foci in G1 und 70 Foci in G2 (Abb. 4.7) macht das etwa 12 % der initialen DSBs aus (Abb. 4.13. B und C). Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass Artemis und ATM sowohl in der langsamen Komponente der Reparatur in G1 als auch in G2 von Bedeutung sind. Der hier beobachtete Artemis- und ATM-abhängige Reparaturdefekt in der G2-Phase ist mit dem Reparaturdefekt in den HR-Mutanten (Brca2, Rad51) (Abb. 4.8.) vergleichbar. Zum Zeitpunkt dieser Untersuchungen war der vergleichbare Reparaturdefekt bereits in primären Fibroblasten in unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen worden. Außerdem lieferten Analysen mit chemischen Inhibitoren gegen ATM in unserer Arbeitsgruppe erste Hinweise darauf, dass ATM im selben Reparaturweg beteiligt ist wie Brca2. Dies konnte auch für Artemis gezeigt werden. Diese Ergebnisse wurden in jüngster Zeit veröffentlicht (Beucher et al. 2009).

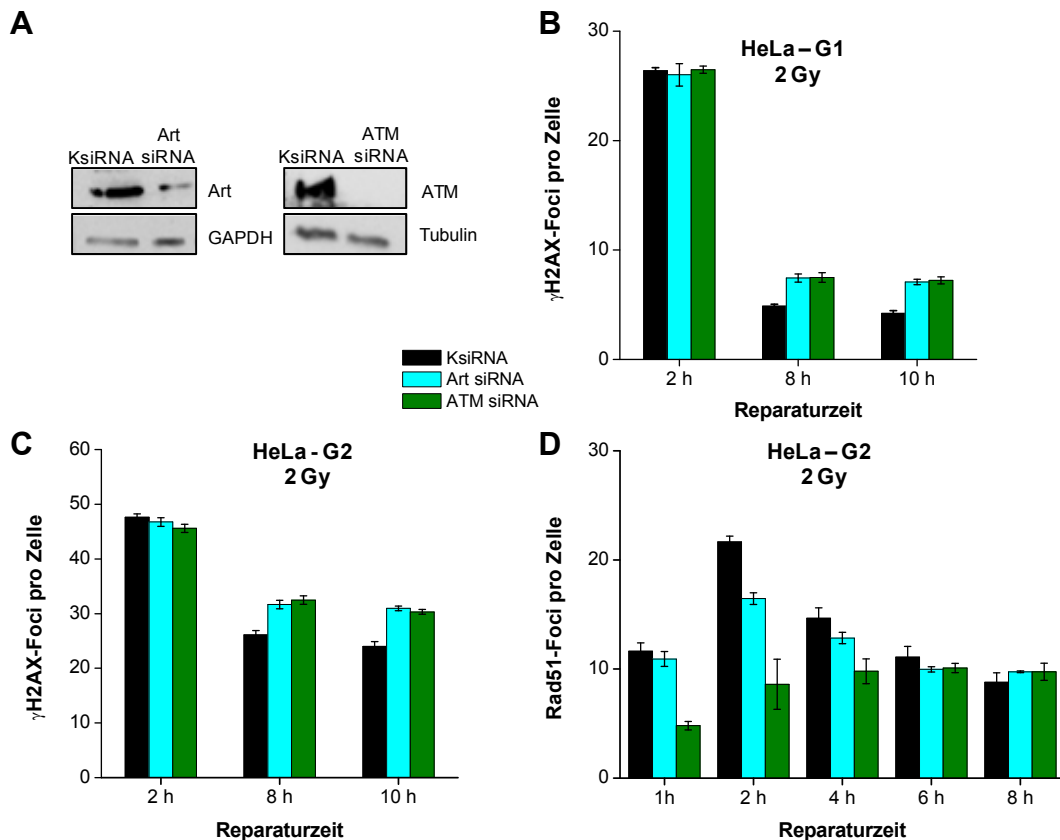


Abb. 4.13. Einfluss verschiedener Proteine auf die DNA-Reparatur in exponentiell wachsenden humanen Tumorzellen

(A) Western-Blot-Analyse zum Nachweis der erfolgreichen siRNA-Transfektion (Art siRNA 15 nM, ATM siRNA 10 nM). 48 h nach Transfektion der siRNA wurden die HeLa-S3-Zellen geerntet und durch Lysepuffer und Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. 100-200 µg Gesamtprotein wurden über SDS-Page elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und mit spezifischen Antikörpern gegen Artemis, ATM, GAPDH und Tubulin inkubiert. Die Detektion der Banden erfolgte über ein Chemilumineszenz-Kit. Dargestellt ist ein repräsentativer Blot aus 3 Experimenten.

(B-D) γH2AX- und Rad51-Foci-Analyse. 48 h nach der Transfektion verschiedener siRNAs wurden HeLa-S3-Zellen mit 2 Gy bestrahlt und nach Ablauf der Reparaturzeit (2 h, 8 h und 10 h) fixiert. Nach der Fixierung wurde die Immunfluoreszenzfärbung von γH2AX und Rad51 durchgeführt. Als Kontrolle wurden unbestrahlte Zellen mitgeführt und identisch behandelt. Die Quantifizierung der γH2AX-Foci erfolgte in den G1- und G2-Zellen. Die Rad51-Foci wurden in den G2-Zellen ausgewertet. Die Kontrollwerte von 0,3-0,6 (G1, γH2AX), 3,2-6,5 (G2, γH2AX) und 0,7-2 (G2, Rad51) wurden abgezogen. Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 Experimenten. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte.

Zur Überprüfung der Annahme, dass Artemis und ATM am gleichen Reparaturweg wie Brca2 und Rad51 beteiligt sind, sollten im Zuge dieser Arbeit HR-spezifische Methoden angewendet werden. Dazu wurde zunächst die Resektion der DSBs anhand der Analyse von Rad51-Foci untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.13. D dargestellt. Die Ausbildung der Rad51-Foci in ATM-defizienten Zellen ist leicht verzögert und erreicht erst nach 4 h das Maximum, welches im Vergleich zu Kontrollzellen jedoch um ca. 50 % beeinträchtigt ist. Das nach 4 h erreichte Maximum bleibt im verbleibenden Reparaturzeitraum konstant. In Artemis-depletierten Zellen kann 2 h nach

Bestrahlung mit 2 Gy ein Maximum von 17 Rad51-Foci beobachtet werden. Dies entspricht einer Verminderung in der Ausbildung der Rad51-Foci von 25 % im Vergleich zu Kontrollzellen. Somit kann sowohl in Artemis- als auch in ATM-depletierten Zellen eine verminderte Rad51-Foci-Ausbildung beobachtet werden. Dieses Ergebnis kann als weiteres Indiz für eine Rolle von Artemis und ATM in der strahleninduzierten HR in G2 betrachtet werden.

4.3.2. Charakterisierung der Resektion von DSBs anhand der Analyse von BrdU-Resektions-Foci

Neben der Analyse der Rad51-Foci als indirekter Marker einer Resektion wurde eine weitere Methode zur direkten Analyse der DSB-Resektion etabliert. Diese Methode beruht auf der direkten Messung der nach Resektion entstandenen einzelsträngigen DNA unabhängig von Reparaturproteinen, die an die ssDNA rekrutiert werden. Hierfür wurden die HeLa-S3-Zellen 24 h mit BrdU markiert, so dass während der Replikation in der S-Phase BrdU anstelle von Thymidin im gesamten Genom eingebaut werden konnte. Nach anschließender Schadensinduktion durch ionisierende Strahlung (4 Gy) und Fixierung nach unterschiedlichen Reparaturzeiten wurden die Zellen unter nicht denaturierenden Bedingungen gegen BrdU gefärbt. Der BrdU-Antikörper kann nur an die durch Resektion frei gelegten einzelsträngigen DNA-Bereiche binden, die als BrdU-Resektions-Foci visualisiert werden können. Die Zellzyklusphasen wurden anhand der spezifischen Färbung des G2-Phase-Markers CENP-F und des DNA-Gehalts identifiziert. Die BrdU-Resektions-Foci treten in CENP-F positiven G2-Zellen auf, während in CENP-F negativen G1-Zellen keine Foci beobachtet werden können. Zur Überprüfung der Linearität zwischen der applizierten Dosis und der auftretenden Menge an BrdU-Resektions-Foci in der G2-Phase wurde der Dosisbereich von 0-40 Gy zum Zeitpunkt des Rad51-Foci-Maximums (2 h) untersucht. Die Anzahl der BrdU-Resektions-Foci steigt im Bereich 0-20 Gy in G2-Zellen linear an. Bei Dosen über 20 Gy ist keine Linearität mehr gegeben, da ab etwa 100 Foci in G2-Zellen eine Sättigung erreicht wird (Abb. 4.14. B) (siehe Kapitel 4.2.1.). Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Dosis von 4 Gy liegt in G2 im linearen Bereich und konnte daher zur quantitativen Analyse der DSB-Resektion und anschließender Reparatur anhand der Analyse von BrdU-Resektions-Foci genutzt werden. Die Linearität der BrdU-Resektions-Foci ist ebenfalls ein eindeutiges Indiz dafür, dass die Entstehung der BrdU-Resektions-Foci schadensabhängig erfolgt und nicht auf unspezifische Bin-

dungen des Antikörpers zurückzuführen ist. Bei einer Strahlendosis von 2 Gy können ca. 19 BrdU-Resektions-Foci gemessen werden (Abb. 4.14. B). Dies entspricht den ausgebildeten Rad51-Foci 2 h nach Bestrahlung mit 2 Gy (Abb. 4.10.). Somit lassen sich die beiden Methoden anteilmäßig vergleichen.

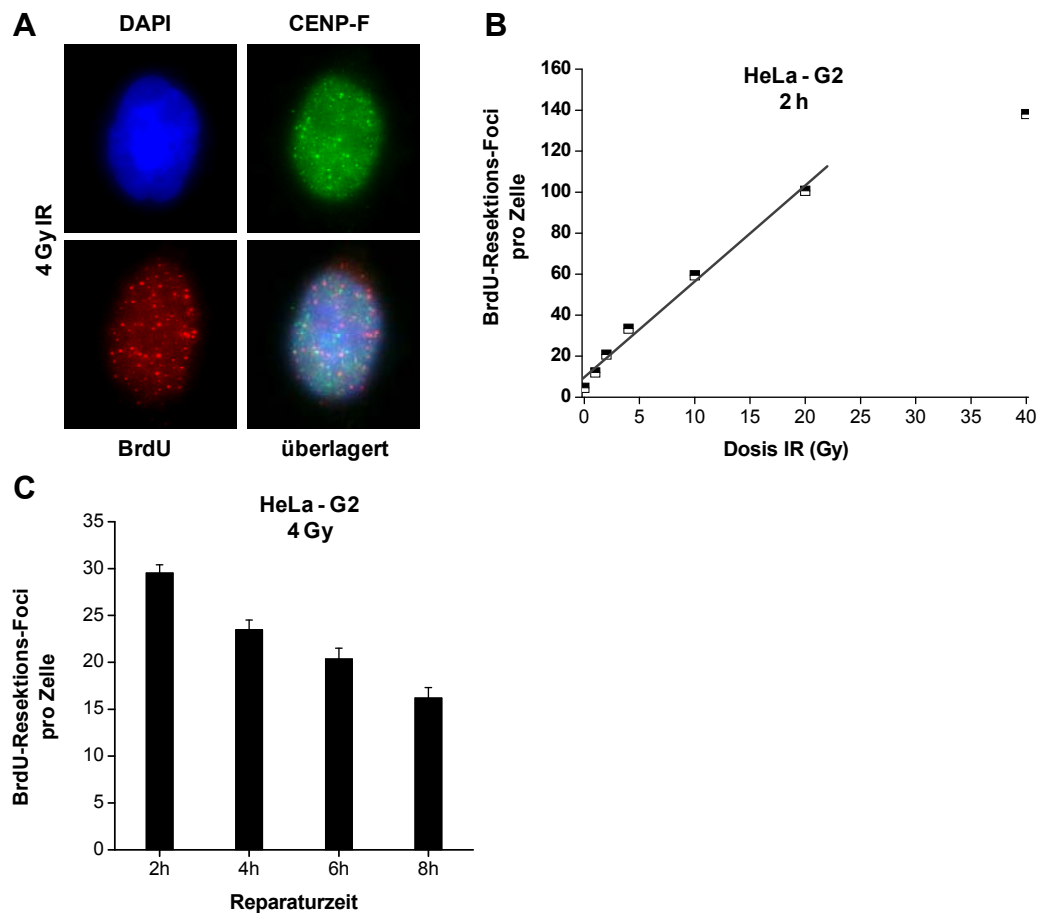


Abb. 4.14. Nachweis der DSB-Resektion anhand der Analyse von BrdU-Resektions-Foci

Die Zellen wurden vor Bestrahlung 24 h mit 15 μ M BrdU markiert, anschließend bestrahlt und mit Aphidicolin versetzt. Nach Ablauf der Reparaturzeit wurden die Zellen fixiert und unter nicht denaturierenden Bedingungen spezifisch mit Antikörpern gegen BrdU und CENP-F gefärbt. Zudem wurden unbestrahlte Kontrollzellen mit Aphidicolin versetzt und einer identischen Behandlung unterzogen. Die Quantifizierung der BrdU-Resektions-Foci erfolgte anhand des CENP-F-Signales in den G2-Zellen.

(A) Immunfluoreszenzfärbung einer bestrahlten HeLa-S3-Zelle in G2 (4 Gy, 2 h) mit Antikörpern gegen BrdU (rot) und CENP-F (grün) aufgenommen bei 630facher Vergrößerung. Die DNA wurde unspezifisch mit DAPI (blau) gegengefärbt.

(B) BrdU-Resektions-Foci in Abhängigkeit von der Dosis (1, 2, 4, 10, 20 und 40 Gy). HeLa-S3-Zellen wurden nach der Bestrahlung 2 h kultiviert. Dargestellt ist der Mittelwert aus 40 G2-Zellen. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung innerhalb der 40 Zellen dar.

(C) BrdU-Resektions-Foci-Kinetik in bestrahlten HeLa-S3-Zellen (4 Gy, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h). Die Kontrollwerte von 5,7-7,3 wurden abgezogen. Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 Experimenten. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte.

Die Kinetik der BrdU-Resektions-Foci ist mit der von Rad51-Foci vergleichbar. 2 h nach Bestrahlung werden ca. 30 Foci erreicht, welche innerhalb der folgenden 6 h auf 16 Foci abfallen. Somit werden 50 % der resektierten DSBs repariert (Abb. 4.14. C).

4.3.3. Untersuchung der Rolle von Artemis und ATM bei der HR in G2-Zellen anhand der Analyse von BrdU-Resektions-Foci

Bevor die Methode der BrdU-Resektions-Foci zur Untersuchung der Rolle von Artemis und ATM bei der HR genutzt werden konnte, sollte die Methode zunächst anhand der für die HR benötigten Proteine Brca2 und Rad51 getestet werden. Dazu wurden HeLa-S3-Zellen mit spezifischer siRNA gegen Brca2, Rad51, Artemis und ATM transfiziert und mit BrdU markiert. Die Zellen wurden mit 4 Gy bestrahlt, nach Ablauf der Reparaturzeit fixiert und mit spezifischen Antikörpern gegen BrdU und CENP-F gefärbt. Die Quantifizierung der BrdU-Resektions-Foci erfolgte in den G2-Zellen.

In der Ausbildung der BrdU-Resektions-Foci sind die Rad51-depletierten Zellen mit den Kontrollzellen vergleichbar. 2 h nach Bestrahlung ist ein Maximum von ca. 29 Foci zu beobachten. Im weiteren Verlauf der Kinetik unterscheiden sich die Rad51-depletierten und die Kontrollzellen voneinander. In Rad51-depletierten Zellen bleibt das Niveau der BrdU-Resektions-Foci innerhalb der verbleibenden Reparaturzeit konstant d.h. die resektierten DSBs verbleiben unrepariert (Abb. 4.15. A). Diese Beobachtung ist übereinstimmend mit der Rolle von Rad51 in der HR. In Anbetracht der Rolle von Brca2 für die Beladung der ssDNA mit Rad51 wurde ein mit Rad51-depletierten Zellen vergleichbarer Verlauf der Kinetik erwartet. Überraschenderweise zeigen Brca2-depletierte Zellen eine um ca. 50 % verminderte Ausbildung der BrdU-Resektions-Foci im Vergleich zu Kontrollzellen. So werden 2 h nach Bestrahlung nur 15 Foci gemessen, die während des gesamten Beobachtungszeitraumes unrepariert verbleiben, erkennbar daran, dass eine Abnahme der Foci-Anzahl ausbleibt (Abb. 4.15. A). Diese gleichbleibende Menge an BrdU-Resektions-Foci ist wiederum konform mit der nicht ablaufenden HR in Brca2-depletierten Zellen. Die verminderte Ausbildung der BrdU-Resektions-Foci führt zu der Annahme, dass ein Defekt in der Resektion der DSBs vorliegt, die aber durch Beucher et. al. (2009) widerlegt wird, da sie anhand der Analyse von RPA-Foci zeigen konnten, dass Brca2-defiziente Zellen keinen Defekt in der Ausbildung resektierter DSBs aufweisen. Diese Beobachtung

deckt sich mit der Rolle von Brca2 beim Austausch von RPA mit Rad51 an den einzelsträngigen Bereichen. Die Bindung von RPA erfolgt mit einer hohen Affinität an die ssDNA (Song and Sung 2000). Bevorzugt bindet das RPA dabei an pyrimidinreiche DNA-Stränge (Kim et al. 1992), was bedeuten würde, dass auch das BrdU durch RPA verdeckt wird. Da Brca2 für den Austausch von RPA durch Rad51 gebraucht wird, könnte Brca2 für eine Auflockerung der starken RPA-Bindung verantwortlich sein. In Abwesenheit von Brca2 kann keine Lockerung stattfinden und somit wird die Bindung des Antikörpers an das BrdU erschwert.

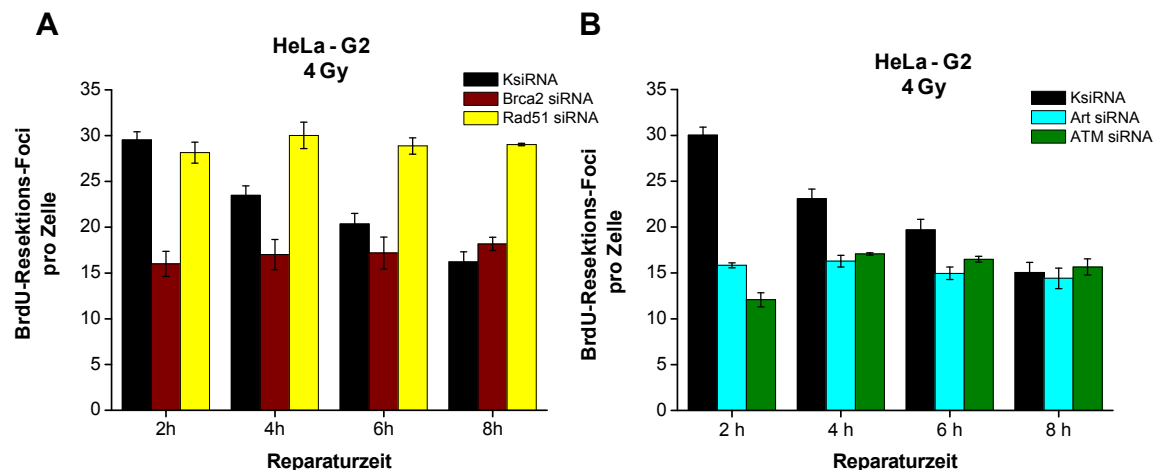


Abb. 4.15. Einfluss verschiedener Proteine auf die DSB-Resektion in G2 exponentiell wachsender humaner Tumorzellen anhand der Analyse von BrdU-Resektions-Foci

(A-B) BrdU-Resektions-Foci-Analyse. 48 h nach Transfektion verschiedener siRNAs (Art siRNA 15 nM, ATM siRNA 10 nM, Brca2 siRNA 25 nM, KsiRNA 20 nM, Rad51 siRNA 10 nM) und der unter 3.2. beschriebenen BrdU-Markierung wurden HeLa-S3-Zellen mit 2 Gy bestrahlt und mit Aphidicplin versetzt. Nach Ablauf der Reparaturzeit (2 h, 4 h, 6 h, 8 h) wurden die Zellen fixiert und unter nicht denaturierenden Bedingungen spezifisch mit Antikörpern gegen BrdU und CENP-F gefärbt. Zudem wurden unbestrahlte Kontrollzellen mit Aphidicolin versetzt und einer identischen Behandlung unterzogen. Die Quantifizierung der BrdU-Resektions-Foci erfolgte anhand des CENP-F-Signals in den G2-Zellen. Die Kontrollwerte von 5,7-7,3 wurden abgezogen. Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 Experimenten. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte.

ATM-depletierte Zellen zeigen eine verzögerte Ausbildung der BrdU-Resektions-Foci. Erst 4 h nach Bestrahlung wird ein Maximum von ca. 15 Foci erreicht, was einer um ca. 50 % verminderten Ausbildung im Vergleich zu Kontrollzellen entspricht. Das erreichte Maximum bleibt in der restlichen Reparaturzeit konstant auf diesem Niveau (Abb. 4.15. B). Diese beobachtete BrdU-Resektions-Foci-Kinetik ähnelt der Rad51-Foci-Kinetik in ATM-depletierten Zellen (Abb. 4.13. D). Artemis-depletierte Zellen weisen ebenfalls einen Defekt in der Ausbildung der BrdU-Resektions-Foci auf. 2 h nach Bestrahlung ist ein Maximum von 15 BrdU-Resektions-Foci zu beobachten, was einer Verminderung von ca. 50 % entspricht. Die Anzahl der BrdU-Resektions-

Foci bleibt im Beobachtungszeitraum konstant, was ein Anzeichen für das Ausbleiben der Reparatur in Abwesenheit von Artemis ist (Abb. 4.15. B).

Zusammenfassend bestätigten diese Ergebnisse die bereits durch die Rad51-Foci-Analyse angedeutete Rolle von Artemis und ATM bei der Resektion von DSBs. Die Resektion ist in Abwesenheit von Artemis und ATM im Gegensatz zur Rad51-Mutante zur Hälfte unterbunden, was für eine teilweise stattfindende HR sprechen könnte. Anhand der γ H2AX-Analyse ist es aber eher vorstellbar, dass die resektierten DSBs nicht zur funktionalen HR führen.

4.3.4. Charakterisierung der HR anhand der Analyse von BrdU-Einbau-Foci

Der Nachweis der Resektion von DSBs in Abwesenheit von Artemis und ATM zeigte, dass eine verminderte Resektion stattfindet und gibt so erste Hinweise auf eine Rolle von Artemis und ATM bei der HR. Um sicher zu stellen, dass trotz stattgefundener Resektion keine HR erfolgt, wurde eine Methode zum direkten Nachweis der vollendeten HR etabliert. Diese Methode beruht erneut auf dem Einbau von BrdU anstelle des Analogons Thymidin. Im Gegensatz zur Analyse resektierter DSBs mit BrdU wurde jetzt das BrdU erst nach Bestrahlung zugegeben, so dass der Einbau des BrdUs erst während der Reparatur der DSBs über die HR stattfinden kann. Dazu wurden HeLa-S3-Zellen mit einer Strahlendosis von 4 Gy behandelt. Nach Ablauf der Reparaturzeit wurden die Zellen fixiert. Zum Nachweis der neusynthetisierten DNA-Bereiche musste das BrdU-Epitop, im Gegensatz zum Nachweis der resektierten DSBs mit BrdU, durch einen Denaturierungsschritt für den Antikörper zugänglich gemacht werden. Die Identifizierung der Zellzyklusphasen erfolgte wie unter 4.3.2. beschrieben durch den G2-Phase-Marker CENP-F. BrdU-Einbau-Foci treten nach Bestrahlung in G2-Zellen auf. In G1-Zellen werden keine BrdU-Einbau-Foci beobachtet. Bei der HR werden größere Bereiche synthetisiert und somit kann mehr BrdU eingebaut werden, als dies bei der langsamen Komponente der Reparatur in G1 der Fall sein könnte. Somit sind nur die nach HR entstandenen synthetisierten Bereiche als Foci sichtbar. Der Einbau bei der Replikation in der S-Phase sollte durch Zugabe von Aphidicolin unterbunden werden. Erstaunlicherweise konnte trotz Zugabe von Aphidicolin ein starker Einbau in den S-Phase Zellen mit schwachem CENP-F-Signal beobachtet werden (Abb. 4.16. A). Aphidicolin inhibiert die an der DNA-Replikation beteiligten DNA-Polymerasen α , δ und ϵ (Wright et al. 1994, Takisawa et al. 2000), wogegen die für die HR bedeutende DNA-Polymerase ν nicht inhibiert wird (Takata

et al. 2006, Moldovan et al. 2010). Der Einbau in der S-Phase ist demnach auf strahleninduzierte HR-Ereignisse zurückzuführen.

Der kinetische Verlauf unterscheidet sich von den bisher angewandten Methoden. So ist keine Abnahme der Foci zu beobachten, sondern eine Zunahme. Innerhalb der 8 h Reparaturzeit steigt die Anzahl der BrdU-Einbau-Foci auf ca. 14 an, d.h. 14 DSBs wurden innerhalb der 8 h über die HR repariert (Abb. 4.16. B). Ein Hinweis für die Richtigkeit dieser Messung ergibt der Vergleich mit der Abnahme der BrdU-Resektions-Foci vom Maximum nach 2 h bis zum 8 h Reparaturzeitpunkt. So werden bei der Methode der BrdU-Resektions-Foci ebenfalls ca. 14 Foci repariert (Abb. 4.14. B).

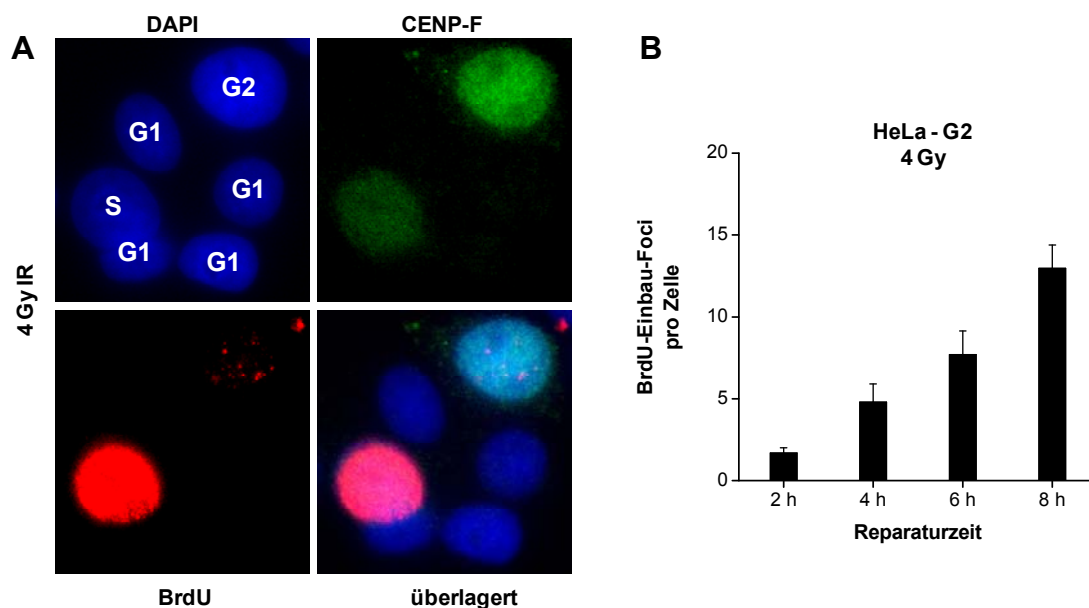


Abb. 4.16. Nachweis erfolgter homologer Rekombination anhand der Analyse von BrdU-Einbau-Foci

HeLa-S3-Zellen wurden mit 4 Gy bestrahlt und mit BrdU (15 μ M) und Aphidicolin versetzt. Nach Ablauf der Reparaturzeit (2 h, 4 h, 6 h, 8 h) wurden die Zellen fixiert und spezifisch mit Antikörpern gegen BrdU und CENP-F gefärbt. Zudem wurden unbestrahlte Zellen identisch behandelt.

(A) Immunfluoreszenzfärbung von bestrahlten HeLa-S3-Zellen (2 h) mit Antikörpern gegen BrdU (rot) und CENP-F (grün) aufgenommen bei 630facher Vergrößerung. Die DNA wurde unspezifisch mit DAPI (blau) gegengefärbt. G2-Zellen zeigen ein intensives pan-nukleäres CENP-F-Signal. S-Zellen zeigen ebenfalls ein flächiges, aber weniger intensives CENP-F-Signal und ein aufgrund der Synthese pan-nukleäres BrdU-Signal. G1-Zellen sind CENP-F negativ.

(B) BrdU-Einbau-Kinetik bestrahlter HeLa-S3-Zellen. Die Kontrollwerte von 2,6-3,4 wurden abgezogen. Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 Experimenten. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte.

4.3.5. Untersuchung der Rolle von Artemis und ATM bei der HR in G2-Zellen anhand der Analyse von BrdU-Einbau-Foci

Auch beim BrdU-Einbau-Assay sollte bevor die Rolle von Artemis und ATM bei der HR untersucht werden kann, die Methode an bereits beschriebenen HR- und NHEJ-

Mutanten (Brca2, Rad51, Ku80, LigIV) überprüft werden. Dazu wurden HeLa-S3-Zellen mit spezifischer siRNA gegen Brca2, Rad51, Ku80, LigIV, Artemis und ATM transfiziert. Die Überprüfung der erfolgreichen Herunterregulation von LigIV erfolgte mittels Western-Blot-Analyse. Die Zellen, die mit spezifischer LigIV siRNA transfiziert wurden, zeigen im Vergleich zu den Kontrollzellen eine Verminderung der Menge des Zielproteins (Abb. 4.17. A). 48 h bzw. 72 h nach Transfektion wurden die Zellen mit 4 Gy bestrahlt und mit BrdU markiert. Nach Ablauf der Reparaturzeit wurden die Zellen fixiert und mit spezifischen Antikörpern gegen BrdU und CENP-F gefärbt. Die Quantifizierung der BrdU-Resektions-Foci erfolgte in den G2-Zellen.

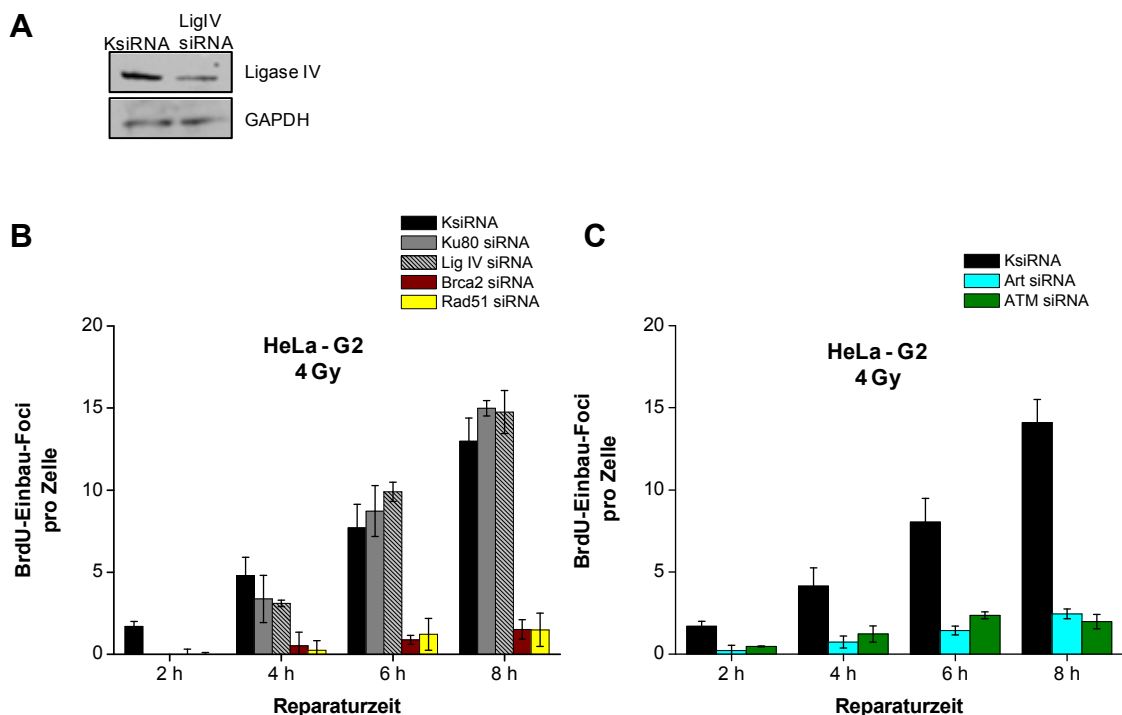


Abb. 4.17. Einfluss verschiedener Proteine auf die homologe Rekombination anhand der Analyse von BrdU-Einbau-Foci in exponentiell wachsenden humanen Tumorzellen

(A) Western-Blot-Analyse zum Nachweis der erfolgreichen siRNA-Transfektion. 72 h nach Transfektion der KsiRNA bzw. LigIV siRNA (15 nM) wurden die HeLa-S3-Zellen geerntet und durch Lysepuffer und Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. 50 µg Gesamtprotein wurden über SDS-Page elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und mit spezifischen Antikörpern gegen LigIV und GAPDH inkubiert. Die Detektion der Banden erfolgte über ein Chemilumineszenz-Kit. Dargestellt ist ein repräsentativer Blot aus 3 Experimenten.

(B-C) BrdU-Einbau-Foci-Analyse. 48 h bzw. 72 h (LigIV siRNA) nach Transfektion der verschiedenen siRNAs (Art siRNA 15 nM, ATM siRNA 10 nM, Brca2 siRNA 25 nM, KsiRNA 20 nM, LigIV siRNA 15 nM, Rad51 siRNA 10 nM) wurden die HeLa-S3-Zellen bestrahlt (4 Gy + Aphidicolin + BrdU (15 µM)). Nach Ablauf der Reparaturzeit (2h, 4 h, 6 h, 8 h) wurden die Zellen fixiert und gegen BrdU und CENP-F gefärbt. Die Quantifizierung der BrdU-Einbau-Foci erfolgte in den G2-Zellen. Als Kontrolle wurden unbestrahlte Zellen identisch behandelt. Die Kontrollwerte von 2,5-3,7 wurden abgezogen. Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 Experimenten. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte.

Gemäß der Bedeutung von Brca2 und Rad51 für die HR kann in den Brca2- und Rad51-depletierten Zellen innerhalb der 8 h Reparaturzeit kein Einbau von BrdU in den G2-Zellen beobachtet werden. Die Herunterregulation von NHEJ-Faktoren wie Ku80 und LigIV hat keinen Einfluss auf den Einbau von BrdU im Vergleich zu Kontrollzellen. Innerhalb der 8 h Reparaturzeit werden ca. 15 DSBs über die HR repariert (Abb. 4.17. B). Die Messung der HR-Ereignisse anhand der Analyse von BrdU-Einbau-Foci eignet sich somit zur Untersuchung von HR.

Die Depletion von Artemis und ATM hat das Ausbleiben von BrdU-Einbau-Foci zur Folge (Abb. 4.17. B). Dieser Verlust ist mit dem von Brca2- und Rad51-Mutanten vergleichbar. Diese Beobachtung ist ein starker Hinweis darauf, dass die in Artemis- und ATM-depletierten Zellen nachgewiesene verminderte Resektion, gemessen anhand der Rad51- und BrdU-Resektions-Foci, nicht zur funktionalen HR führt. Artemis und ATM scheinen demnach die HR von strahleninduzierten Brüchen in der G2-Phase zu fördern.

4.4. Einfluss des Heterochromatins auf die HR

In jüngsten Studien konnte gezeigt werden, dass die langsame Reparatur in der G1-Phase innerhalb des Heterochromatins erfolgt (Goodarzi et al. 2008). Bei der langsamen Komponente in G2 handelt es sich um die HR (Beucher et al. 2009). Es stellte sich daher die Frage, ob die HR ebenfalls im Heterochromatin lokalisiert ist.

4.4.1. Untersuchung des Einflusses des Heterochromatins auf die ATM-abhängige Reparatur

Es wurde bereits publiziert, dass ATM den Heterochromatin-bildenden Faktor Kap1 phosphoryliert (Ziv et al. 2006). Weiterhin konnte in Goodarzi et al. (2008) eine fördernde Rolle von ATM bei der Reparatur von strahleninduzierten DSBs im heterochromatischen Bereich beschrieben werden. Aus diesem Grund sollte zunächst überprüft werden, ob ATM neben der Reparatur von DSBs im heterochromatischen Bereich in der G1-Phase auch die Reparatur von DSBs im Heterochromatin in der G2-Phase fördert. Dazu wurde in einer HeLa-S3-Zelllinie neben ATM auch der Heterochromatin-bildende Faktor Kap1 mit Hilfe von siRNA ausgeschaltet. Die Kontrolle der Herunterregulation von Kap1 erfolgte durch Nachweis des Proteins mittels Western-Blot-Analyse. Die spezifisch-transfizierten Zellen zeigen im Vergleich zu KsiRNA-transfizierten Zellen eine Verminderung der Menge des Zielproteins

(Abb. 4.18. A). 48 h nach Transfektion mit siRNA wurden die Zellen einer Strahlendosis von 2 Gy ausgesetzt, nach Ablauf der Reparaturzeit fixiert und anschließend gegen Rad51/ γ H2AX bzw. BrdU/CENP-F gefärbt. Die Quantifizierung der Foci erfolgte in den G2-Zellen.

Die alleinige Herunterregulation von Kap1 hat keinen Einfluss auf die Reparaturkinetik in G2, gemessen anhand der Analyse der γ H2AX-Foci. Die Reparatur erfolgt mit der gleichen Kinetik wie in Kontrollzellen. Die gleichzeitige Depletion von ATM und Kap1 führt zum Aufheben des ATM-abhängigen Reparaturdefekts in der G2-Phase. So sind in diesen Zellen 8 h nach Bestrahlung noch ca. 25 DSBs unrepariert, was mit den Kontrollzellen identisch ist (Abb. 4.18. B). In Abwesenheit von ATM beträgt die Foci-Zahl nach 8 Stunden 30 Foci.

Im folgenden Teil der Arbeit sollte der Reparaturweg nach Depletion von ATM und Kap1 anhand der Analyse von Rad51-Foci und BrdU-Einbau-Foci genauer charakterisiert werden. In Kap1-depletierten Zellen kann 2 h nach Bestrahlung ein Maximum von ca. 14 Rad51-Foci beobachtet werden. Dies entspricht einer Einschränkung von ca. 25 % im Vergleich zu Kontrollzellen. Die gleichzeitige Herunterregulation von ATM und Kap1 zeigt ebenfalls eine verminderte Ausbildung der Rad51-Foci, was sich in einem Maximum von ca. 11 Rad51-Foci äußert (Abb. 4.18. C). Diese Ergebnisse deuten an, dass die Depletion des Heterochromatin-bildenden Faktors Kap1 einen frühen Schritt der HR beeinflusst. Über welchen Reparaturweg die DSBs in einem Kap1- und ATM-depletierten Hintergrund repariert werden, wurde anhand der Analyse der BrdU-Einbau-Foci überprüft. Bereits bei der Depletion von Kap1 konnte eine Reduktion der HR-Ereignisse beobachtet werden. Innerhalb der 8 h Reparaturzeit werden nur ca. 6 BrdU-Einbau-Foci gebildet. In Kap1/ATM siRNA-transfizierten Zellen ist ein ähnliches Verhalten zu beobachten. 8 h nach Bestrahlung sind ebenfalls 6 BrdU-Einbau-Foci sichtbar (Abb. 4.18. D).

Trotz des verminderten Ablaufs der HR, gemessen anhand der Analyse von BrdU-Einbau-Foci, konnte in Kap1 und Kap1/ATM-depletierten Zellen kein Reparaturdefekt anhand der Analyse von γ H2AX-Foci beobachtet werden. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass nach Depletion von Kap1 und somit einer wahrscheinlichen Öffnung des Heterochromatins die Reparatur der DSBs trotz erfolgter Resektion nicht vorrangig über die HR abläuft.

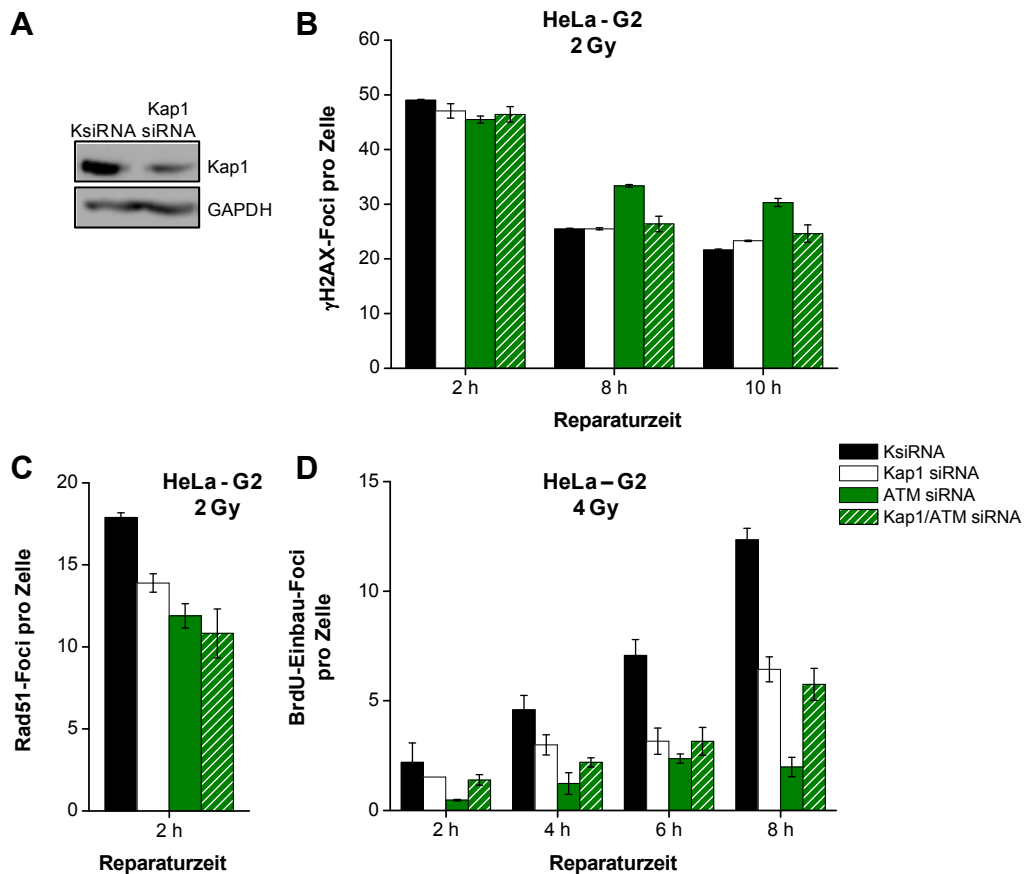


Abb. 4.18. Einfluss des Heterochromatinstatus auf die Reparatur in der G1- und G2-Phase ATM-depletierter Zellen.

(A) Western-Blot-Analyse zum Nachweis der erfolgreichen siRNA-Transfektion. 48 h nach Transfektion der KsiRNA bzw. Kap1 siRNA (20 nM) wurden die HeLa-S3-Zellen geerntet und durch Lysepuffer und Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. 100 µg Gesamtprotein wurden über SDS-Page elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und mit spezifischen Antikörpern gegen Kap1 und GAPDH inkubiert. Die Detektion der Banden erfolgte über ein Chemilumineszenz-Kit. Dargestellt ist ein repräsentativer Blot aus 3 Experimenten.

(B-D) 48 h nach Transfektion der siRNAs (ATM siRNA 10 nM, KsiRNA 20 nM, Kap siRNA 20 nM) wurden HeLa-S3-Zellen bestrahlt und nach Ablauf der Reparaturzeit (2 h, 4 h, 6 h, 8 h und 10 h) fixiert.

(B-C) γ H2AX- und Rad51-Foci-Analyse. Nach Bestrahlung wurden die Zellen mit Aphidicolin und Nocodazol versetzt. Nach Fixierung der Zellen erfolgte eine Immunfluoreszenzfärbung von γ H2AX/Rad51. Als Kontrolle wurden unbestrahlte Zellen identisch behandelt. Die Kontrollwerte von 4,5-7 (γ H2AX/G2) und 1-2 (Rad51) wurden abgezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Experimenten. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte.

(D) BrdU-Einbau-Foci-Analyse. Nach Bestrahlung wurden die Zellen mit Aphidicolin und BrdU versetzt. Nach Fixierung der Zellen erfolgte eine Immunfluoreszenzfärbung von BrdU/CENP-F. Als Kontrolle wurden unbestrahlte Zellen identisch behandelt. Die Kontrollwerte von 2,5-3,7 wurden abgezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Experimenten. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte.

4.4.2. Untersuchung zur Wahl des Reparaturweges in Abhängigkeit vom Heterochromatinstatus

Im vorherigen Kapitel konnte gezeigt werden, dass die Depletion von Kap1 die Reparatur von DSBs in ATM-depletierten Zellen zu lässt. Daraus konnte geschlossen wer-

den, dass durch Änderung des Heterochromatinstatus die Zelle für die Reparatur der DSBs weniger HR benützt. Diese Annahme ließe erwarten, dass auch der Reparaturdefekt in Brca2-defizienten Zellen durch Depletion von Kap1 aufgehoben werden kann. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde neben dem HR-Faktor Brca2 bzw. Rad51 gleichzeitig der Heterochromatin-bildende Faktor Kap1 mittels siRNA in HeLa-S3- und 82-6hTert-Zellen herunterreguliert. Anschließend wurden die Zellen mit 2 Gy bzw. 4 Gy bestrahlt und nach Ablauf der Reparaturzeit fixiert. Nach spezifischer Färbung von γ H2AX/Rad51 bzw. BrdU/CENP-F wurden die Foci in G1 und G2 quantifiziert.

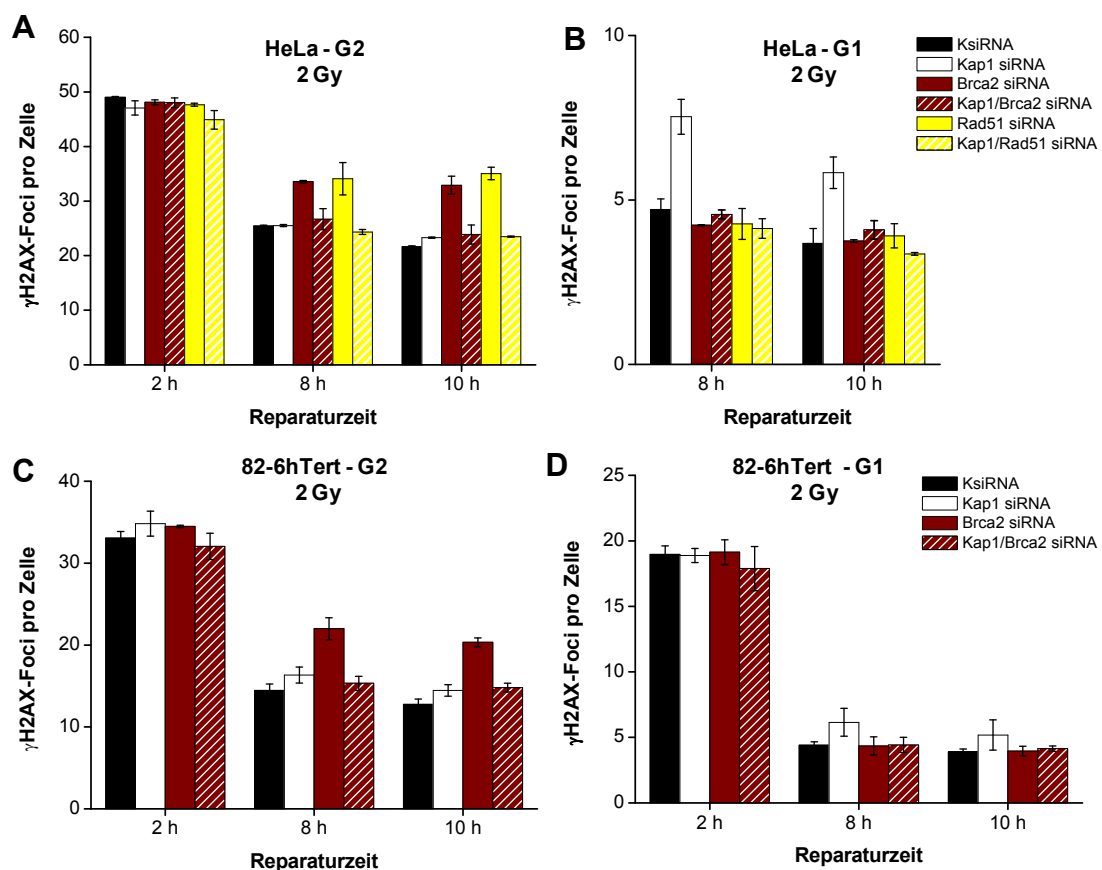


Abb. 4.19. Einfluss des Heterochromatinstatus auf die Reparatur in HR-depletierten Zellen.

(A-D) 48 h nach Transfektion der siRNAs (Brca2 siRNA 25 nM, KsiRNA 20 nM, Kap siRNA 20 nM, Rad51 siRNA 10 nM) wurden HeLa-S3-Zellen (A-B) und 82-6hTert-Zellen (C-D) bestrahlt (2 Gy + Aphidicolin + Nocodazol). Nach Ablauf der Reparaturzeit (2 h, 8 h und 10 h) wurden die Zellen fixiert und mit Antikörpern spezifisch gegen γ H2AX gefärbt. Als Kontrolle wurden unbestrahlte Zellen identisch behandelt. Die Kontrollwerte von 4,5-7 (HeLa G2), 0,3-0,6 (HeLa G1), 1,7-4 (82-6hTert G2) und 0,18-0,27 (82-6hTert G1) wurden abgezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Experimenten. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte.

In den HeLa-S3-Zellen kann im Vergleich zu 82-6hTert-Zellen ein erhöhtes Niveau an γ H2AX-Foci beobachtet werden. Während in der G2-Phase bei HeLa-S3-Zellen 2, 8 und 10 h nach Bestrahlung ca. 50, 26 und 22 Foci auftreten, weisen die 82-6hTert-Zellen ca. 33, 15 und 12 Foci auf. Wichtig ist jedoch, dass in beiden Zelllinien gezeigt werden konnte, dass der Brca2- bzw. Rad51-abhängige Reparaturdefekt in der langsamen Komponente in der G2-Phase durch Ausschalten von Kap1 aufgehoben werden kann (Abb. 4.19. A und C). So werden die ca. 8-10 unrepariert verbleibenden DSBs nach Depletion von Brca2 und Rad51 in HeLa-S3-Zellen als auch in 82-6hTert-Zellen unter Kap1-depletierten Bedingungen repariert.

Ein unerwartetes Ergebnis konnte in den G1-Zellen beobachtet werden. So wiesen die HeLa-S3-Zellen nach alleiniger Depletion von Kap1 8 h nach Bestrahlung in G1 eine um 3 Foci erhöhte Anzahl an γ H2AX-Foci im Vergleich zu Kontrollzellen auf (Abb. 4.19. B). Dieser Defekt nimmt jedoch im Laufe der Reparaturzeit ab und könnte daher auf eine verzögerte Reparatur hindeuten. Dagegen führte die gleichzeitige Depletion von Brca2 bzw. Rad51 und Kap1 zu keinem Zeitpunkt der Reparatur zu einer erhöhten Menge an γ H2AX-Foci verglichen mit Kontrollzellen (Abb. 4.19. B und D). Bisher ist jedoch unklar, warum bei einer gleichzeitigen Depletion von HR-Faktoren mit Kap1 keine Verzögerung der Reparatur in G1 zu beobachten ist, während die alleinige Kap1-Depletion eine Verzögerung der Reparatur zur Folge hat. In den 82-6hTert-Zellen führt die Depletion von Kap1 in G1 jedoch kaum zu einem Unterschied im Vergleich zu Kontrollzellen (Abb. 4.19. D). Das Ausmaß der beobachteten Verzögerung der Reparatur nach Kap1-Depletion könnte daher von der Zelllinie abhängig sein.

Um auszuschließen, dass das beobachtete Aufheben des Reparaturdefekts in HR-Mutanten durch Depletion von Kap1 nicht auf eine ineffiziente Depletion von zwei Faktoren in ein und derselben Zelllinie zurückzuführen ist, wurden in diesen Ansätzen zusätzlich Rad51-Foci ausgewertet. Das Ausbleiben der Ausbildung der Rad51-Foci in Brca2/Kap1- und Rad51/Kap1-depletierten Zellen bestätigt die erfolgreiche Herunterregulation der Faktoren (Abb. 4.20. A und B).

Das Aufheben des Reparaturdefekts einer HR-Mutante durch Depletion von Kap1 und somit eine wahrscheinliche Änderung des Heterochromatinstatus besagen, dass die Zellen die strahleninduzierten DSBs unabhängig von der HR beseitigen können. Zur Bestätigung wurde daher die vollendete HR in den Brca2/Kap1-depletierten Zellen untersucht. Dabei konnte beobachtet werden, dass keine BrdU-Einbau-Foci in

Brca2/Kap1-depletierten Zellen nachweisbar sind (Abb. 4.20. C). Dies verdeutlicht, dass keine HR stattgefunden hat und bestätigt somit die zu Beginn aufgestellte Vermutung, dass Zellen mit geöffnetem Heterochromatin weniger HR benutzen.

Zusammenfassend unterstützen die Ergebnisse die Annahme, dass die strahleninduzierte HR in der G2-Phase im Heterochromatin lokalisiert ist, da durch Verhinderung der Ausbildung des Heterochromatins der Reparaturdefekt in HR-defekten (Brca2, Rad51) Zellen aufgehoben werden kann.

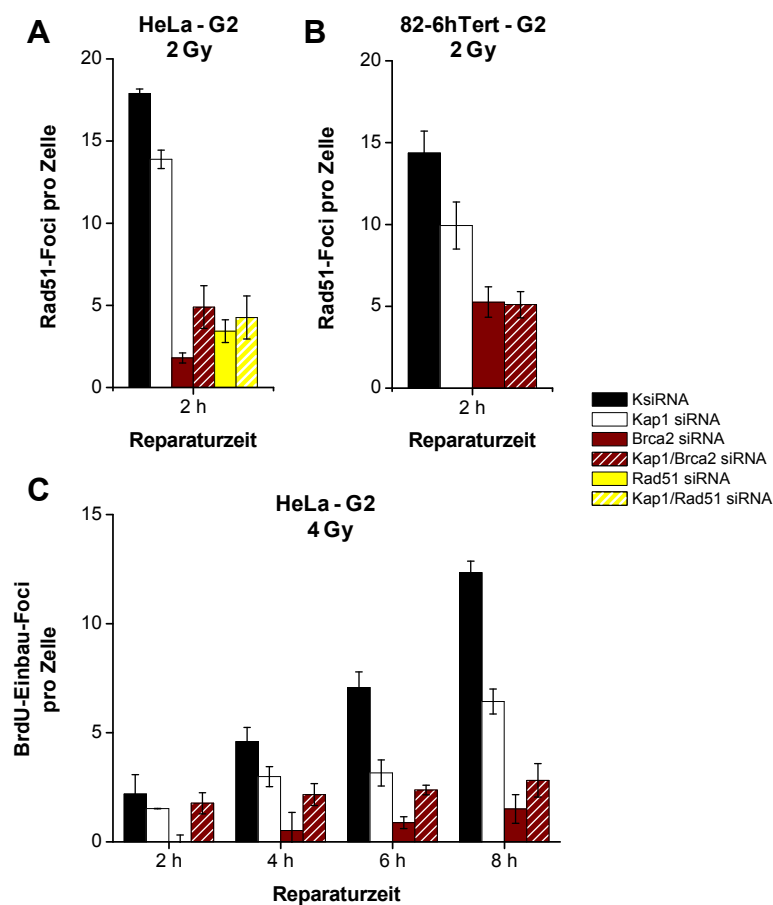


Abb. 4.20. Einfluss des Heterochromatinstatus auf die HR-spezifische Reparatur in HR-depletierten Zellen.

(A-C) 48 h nach Transfektion der siRNAs (Brca2 siRNA 25 nM, KsiRNA 20 nM, Kap siRNA 20 nM, Rad51 siRNA 10 nM) wurden HeLa-S3-Zellen (A,C) und 82-6hTert-Zellen (B) bestrahlt. Für die Rad51-Foci-Analyse wurden die Zellen mit 2 Gy (+ Aphidicolin + Nocodazol) (A,B) und für die BrdU-Einbau-Foci-Analyse mit 4 Gy (+ Aphidicolin + BrdU) (C) bestrahlt. Nach Ablauf der Reparaturzeit (2 h, 4 h, 6 h, 8 h und 10 h) wurden die Zellen fixiert und spezifisch mit Antikörpern gegen γ H2AX/Rad51 bzw. CENP-F/BrdU gefärbt. Als Kontrolle wurden unbestrahlte Zellen identisch behandelt. Die Kontrollwerte von 1-2 (HeLa Rad51), 2,5-3,7 (HeLa BrdU) und 0,4-0,9 (82-6hTert Rad51) wurden abgezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 2 - 3 Experimenten. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte.

4.5. Einfluss von CtIP auf die Reparatur in G1 und G2

Im vorherigen Teil der Arbeit konnte dargelegt werden, dass durch Öffnen des Heterochromatins die Wahl des Reparaturweges beeinflusst wird. Zwischenzeitlich wurde in der Literatur beschrieben, dass die Verhinderung der Resektion der DSBs ebenfalls einen Wechsel von HR zum NHEJ zur Folge hat (Bennardo et al. 2008). In diesen Studien wurde die Resektion durch Herunterregulation von CtIP unterbunden, einem Faktor der die Resektion der DSBs begünstigt. Anschließend erfolgte die Messung chromosomaler Ereignisse. Dabei konnte festgestellt werden, dass nach Depletion von CtIP vermehrt chromosomale Ereignisse stattfanden, die für das NHEJ kennzeichnend sind, während die für die HR charakteristischen chromosomalen Ereignisse seltener auftraten.

Es stellte sich nun die Frage, ob auch in unseren Studien eine Verhinderung des initialen Schrittes der HR durch Depletion von CtIP einen Einfluss auf die Wahl des Reparaturweges hat. Im nachfolgenden Teil der Arbeit soll daher die Rolle von CtIP bei der langsamen Reparatur untersucht werden.

4.5.1. Charakterisierung der CtIP-abhängigen Reparatur

Zur Erforschung der Bedeutung von CtIP für die Reparatur wurden HeLa-S3-Zellen mit einer CtIP siRNA transfiziert. Die Kontrolle der Herunterregulation von CtIP erfolgte durch Nachweis des Proteins mittels Western-Blot-Analyse. Die spezifisch-transfizierten Zellen zeigen im Vergleich zu KsiRNA-transfizierten Zellen eine Verminderung der Menge des Zielproteins (Abb. 4.21. A). 48 h nach siRNA-Transfektion wurden die Zellen mit 2 Gy bestrahlt, nach Ablauf der Reparaturzeit fixiert und mit spezifischen Antikörpern gegen γ H2AX und Rad51 gefärbt. Die Quantifizierung der Foci erfolgte in den G1- und G2-Zellen.

Die Depletion von CtIP hat einen Defekt in der Ausbildung der Rad51-Foci zur Folge. So treten 2 h nach Bestrahlung mit 2 Gy nur 5 Rad51-Foci auf (Abb. 4.21. B). Diese Beobachtung stimmt mit der beschriebenen Funktion von CtIP bei der DSB-Endresektion überein (Sartori et al. 2007, Huertas et al. 2008). Neben der Resektion wird auch die Reparatur der strahleninduzierten DSBs, gemessen anhand der γ H2AX-Foci, in der G2-Phase beeinflusst. Während in Kontrollzellen nach 10 h noch ca. 25 DSBs unrepariert vorliegen, sind in CtIP-depletierten Zellen nur noch 22 γ H2AX-Foci vorhanden. Dieser Reparaturunterschied ist bereits 8 h nach Bestrahlung sichtbar (Abb. 4.21. B). Verglichen mit den Kontrollzellen scheint die Depletion

von CtIP die langsame Komponente der Reparatur durch eine schnellere zu ersetzen. Im Gegensatz zur Reparatur in G2 hat der Verlust von CtIP in der G1-Phase keinen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Reparatur. Hier konnte zu allen Reparaturzeitpunkten ein mit Kontrollzellen vergleichbares Niveau an γ H2AX-Foci beobachtet werden (Abb. 4.21. C).

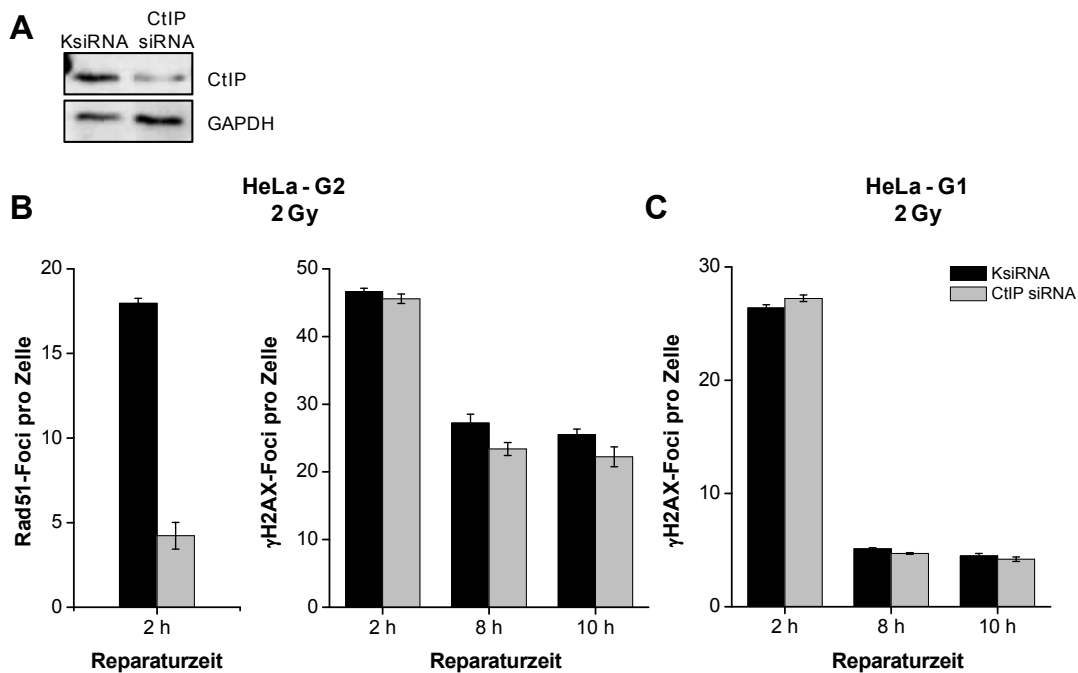


Abb. 4.21. DNA-Reparatur in CtIP-depletierten Zellen nach strahleninduzierten Schäden

(A) Western-Blot-Analyse zum Nachweis der erfolgreichen siRNA-Transfektion. 48 h nach Transfektion der KsiRNA bzw. CtIP siRNA (50 nM) wurden die HeLa-S3-Zellen geerntet und durch Lysepuffer und Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. 100 μ g Gesamtprotein wurden über SDS-Page elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und mit spezifischen Antikörpern gegen CtIP und GAPDH inkubiert. Die Detektion der Banden erfolgte über ein Chemilumineszenz-Kit. Dargestellt ist ein repräsentativer Blot aus 3 Experimenten.

(B-C) γ H2AX- und Rad51-Foci-Analyse. HeLa-S3-Zellen wurden mit CtIP und KsiRNA (50 nM) transfiziert und 48 h später bestrahlt (2 Gy + Aphidicolin + Nocodazol). Nach Ablauf der Reparaturzeit (2 h, 8 h, 10 h) wurden die Zellen fixiert. Nach der γ H2AX- und Rad51-Färbung wurden die Foci quantifiziert. Die Kontrollen von 5-7 (G2 γ H2AX), 1-2 (G2 Rad51) **(B)** und 0,3-0,7 (G1 γ H2AX) **(C)** wurden abgezogen.

4.5.2. Untersuchungen zum Einfluss von CtIP auf die Artemis- und ATM-abhängige Reparatur in der G2-Phase

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Artemis und ATM für eine vollständige und saubere Resektion der DSBs notwendig sind (Kapitel 4.2.). Es stellte sich nun die Frage, ob durch Unterbinden der DSB-Endresektion auch die Notwendigkeit von Artemis und ATM bei der Reparatur der DSBs aufgehoben werden kann. Dazu wurden zum einen 82-6hTert-Zellen und eine Artemis-defiziente Zelllinie

(CJhTert) mit spezifischer CtIP siRNA transfiziert und zum anderen wurde in HeLa-S3- und 82-6hTert-Zellen neben Artemis bzw. ATM gleichzeitig CtIP herunterreguliert. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion mit 2 Gy bestrahlt, nach Ablauf der Reparaturzeit fixiert und mit spezifischen Antikörpern gegen Rad51 und γ H2AX gefärbt. Die Auswertung der Foci erfolgte in den G2-Zellen.

Durch Depletion von CtIP in CJhTert-Zellen kann der Artemis-abhängige Reparaturdefekt aufgehoben werden. So wird das um ca. 9 Foci erhöhte Niveau an γ H2AX-Foci zu späteren Reparaturzeiten im Vergleich zu 82-6hTert-Zellen durch Depletion von CtIP beseitigt (Abb. 4.22. A). Das Aufheben des Artemis-abhängigen Reparaturdefekts kann weiterhin durch doppelte siRNA-Transfektion in 82-6hTert und HeLa-S3-Zellen bestätigt werden. Auch hier kann das erhöhte Maß an γ H2AX-Foci in der langsamen Komponente der Reparatur nach Depletion von Artemis durch Herunterregulation von CtIP aufgehoben werden (Abb. 4.22. B, C). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass in HeLa-S3-Zellen die Depletion von Artemis/CtIP eine mit CtIP-depletierten Zellen vergleichbare schnellere Kinetik in der G2-Phase zur Folge hat. Dieses Verhalten konnte in den 82-6hTert- und den CJhTert-Zellen nicht beobachtet werden. Da die Transfektion von 82-6hTert-Zellen schwieriger als die von Tumorzellen ist, ist es denkbar, dass eine weniger effiziente siRNA-Transfektion in 82-6hTert-Zellen die Unterscheidung geringer Effekte unmöglich macht. Um zu überprüfen, dass jedoch eine ausreichende effiziente siRNA-Transfektion zur Bestimmung größerer Effekte stattgefunden hat, wurde zusätzlich die Ausbildung der Rad51-Foci betrachtet. In allen 3 Zelllinien kann nach Depletion von CtIP oder Artemis/CtIP 2 h nach Bestrahlung nur 4-5 Rad51-Foci beobachtet werden. Dies verdeutlicht, dass keine Resektion stattfinden kann und bestätigt somit eine erfolgreiche Herunterregulation.

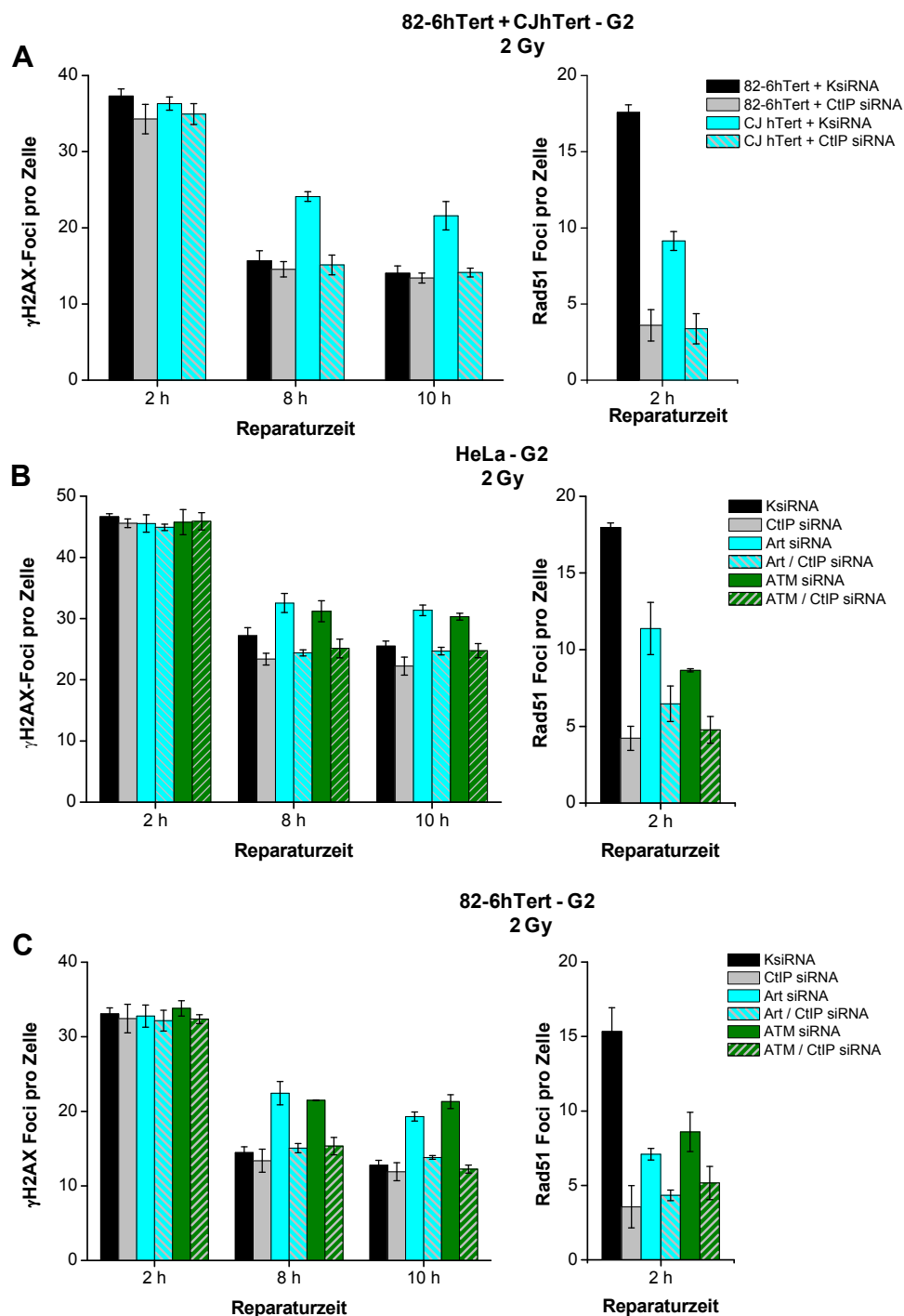


Abb. 4.22. DNA-Reparatur in Art/CtIP- und ATM/CtIP-depletierten Zellen nach strahleninduzierten Schäden in der G2-Phase

(A-C) 48 h nach siRNA Transfektion (Art siRNA 15 nM, ATM siRNA 10 nM, CtIP siRNA 50 nM, KsiRNA 20 nM, Kap siRNA 20 nM) wurden 82-6hTert- und CJhTert-Zellen (A), HeLa-S3-Zellen (B) und 82-6hTert-Zellen (C) bestrahlt (2 Gy + Aphidicolin + Nocodazol). Nach Ablauf der Reparaturzeit (2 h, 8 h, 10 h) wurden die Zellen fixiert. Unbestrahlte Zellen wurden identisch behandelt. Nach der γH2AX- und Rad51-Färbung wurden die Foci in der G1- und G2-Phase quantifiziert. Kontrollen von 2,8-3,8 (γH2AX 82-6hTert), 2,5-2,9 (γH2AX CJhTert), 5,4-7,3 (γH2AX HeLa), 0,3-0,9 (Rad51 82-6hTert), 0,3-0,8 (Rad51 CJhTert), und 1,2-1,9 (Rad51 HeLa) wurden abgezogen.

Neben der Artemis-Abhängigkeit konnte durch Verhindern der Resektion auch die ATM-abhängige Reparatur in der G2-Phase unterbunden werden. So konnte sowohl in 82-6hTert als auch in HeLa-S3-Zellen der durch Herunterregulation von ATM hervorgerufene Reparaturdefekt von ca. 9 Foci in der langsamen Komponente in der G2-Phase durch zusätzliche Depletion von CtIP aufgehoben werden. Auch im Fall der ATM/CtIP-Depletion konnte in HeLa-S3-Zellen eine im Vergleich zu Kontrollzellen schnellere Reparatur beobachtet werden, während in 82-6hTert Zellen eine mit Kontrollzellen vergleichbare Kinetik nachgewiesen werden kann. Zur Kontrolle einer effizienten siRNA-Transfektion wurden ebenfalls Rad51-Foci ausgewertet. Auch hier treten nur 4-5 Rad51-Foci 2 h nach Bestrahlung in ATM/CtIP-depletierten Zellen auf. Die Resultate lassen vermuten, dass sowohl die Artemis- als auch die ATM-Abhängigkeit durch CtIP-initiierte DSB-Resektion herbeigeführt wird. Durch Unterbinden der DSB-Endresektion kann die Notwendigkeit von Artemis und ATM bei der Reparatur der DSBs aufgehoben werden.

4.5.3. Untersuchungen zum Einfluss von CtIP auf die Artemis- und ATM-abhängige Reparatur in der G1-Phase

Wie bereits beschrieben und in dieser Arbeit bestätigt werden konnte, spielen Artemis und ATM nicht nur in der langsamen Reparaturkomponente in der G2-Phase eine Rolle, sondern sind auch in der langsamen Reparatur der G1-Phase von Bedeutung. Die Artemis- und ATM-Abhängigkeit in der langsamen Komponente der Reparatur in der G2-Phase scheint, wie unter 4.5.2. beschrieben, durch die CtIP-initiierte Anresektion der DSBs hervorgerufen zu werden. Aufgrund neuester Erkenntnisse, dass CtIP neben der Resektion der DSBs in der S- und G2-Phase auch nach Bestrahlung in der G1-Phase aktiv ist (Yun and Hiom, 2009), kann vermutet werden, dass auch in der G1-Phase die Artemis- und ATM-Abhängigkeit durch eine CtIP-vermittelte Anresektion der DSBs ausgelöst wird. Zur Überprüfung dieser Möglichkeit wurden, wie unter 4.5.2. beschrieben, drei Zelllinien behandelt, bestrahlt, fixiert und gefärbt. Die Quantifizierung der Foci erfolgte in den G1-Zellen. Das Ergebnis ist in Abb. 4.23. dargestellt.

In allen drei Zelllinien kann nach Behandlung und Bestrahlung ein identisches Verhalten beobachtet werden. Wie vermutet wurde, konnte das um ca. 5 erhöhte Niveau der γ H2AX-Foci zu späteren Reparaturzeitpunkten in Artemis-defizienten bzw. -depletierten Zellen durch den Einsatz von CtIP siRNA aufgehoben werden. Die Re-

paratur der DSBs ist nun mit der Reparatur in Kontrollzellen vergleichbar, d.h. die Artemis-abhängigen DSBs in der G1-Phase können nach Depletion von CtIP repariert werden. Die Herunterregulation von CtIP in ATM-depletierten Zellen führt zu einem ähnlichen Verhalten wie in Artemis-defizienten bzw. Artemis-depletierten Zellen. So verschwindet der Reparaturdefekt von ca. 5 γ H2AX-Foci in der langsamen Reparaturkomponente nach Depletion von CtIP, d.h. die ATM-abhängigen DSBs können nun repariert werden.

Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse vermuten, dass nicht nur die Artemis- und ATM-Abhängigkeit in der G2-Phase durch Resektion der DSBs entsteht, sondern auch in der G1-Phase der Grund der Artemis- und ATM-Abhängigkeit in der langsamen Reparaturkomponente in einer CtIP-vermittelten Funktion zu suchen ist.

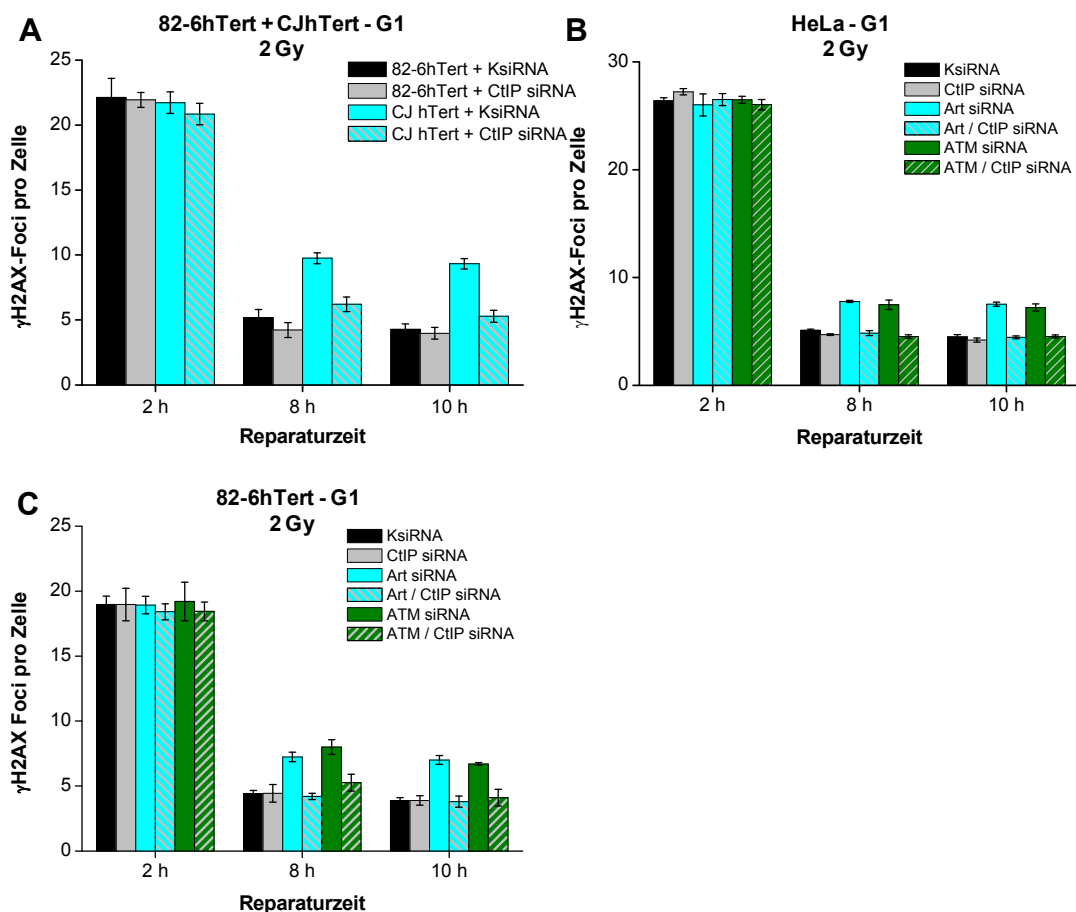


Abb. 4.23. DNA-Reparatur in Art/CtIP- und ATM/CtIP-depletierten Zellen nach strahleninduzierten Schäden in der G1-Phase

(A-C) 48 h nach siRNA Transfektion (Art siRNA 15 nM, ATM siRNA 10 nM, CtIP siRNA 50 nM, KsiRNA 20 nM, Kap siRNA 20 nM) wurden 82-6hTert- und CJhTert-Zellen (A), HeLa-S3-Zellen (B) und 82-6hTert-Zellen (C) bestrahlt (2 Gy + Aphidicolin + Nocodazol). Nach Ablauf der Reparaturzeit (2 h, 8 h, 10 h, 24 h) wurden die Zellen fixiert. Unbestrahlte Zellen wurden identisch behandelt. Nach der γ H2AX-Färbung wurden die Foci in den G1-Zellen quantifiziert. Kontrollen von 0,2-0,3 (82-6hTert), 0,2-0,7 (CJhTert) und 0,3-0,5 (HeLa) wurden abgezogen.

4.5.4. Untersuchungen zum Einfluss der Resektion von DSBs auf die Artemis- und ATM-Abhängigkeit nach Transfektion von CtIP-Mutanten in der G2-Phase

Im Folgenden soll überprüft werden, ob die durch CtIP-vermittelte Resektion oder eine andere Funktion von CtIP die Artemis- und ATM-Abhängigkeit in der G2-Phase hervorruft. Für diese Überprüfung ist es wichtig zu wissen, dass die Initiation der Resektion von DSBs durch die Phosphorylierung von CtIP am Threonin 847 reguliert wird (Huertas et al. 2008). Im weiteren Verlauf der Arbeit sollten daher Artemis- bzw. ATM-depletierte Zellen mit CtIP-Mutanten, die am Threonin 847 mutiert sind, komplementiert werden.

In diesem Versuch wurde das pEGFP-C1 Plasmid genutzt, in das die humane cDNA des CtIPs [gi:42718014] in die „multiple cloning site“ kloniert wurde, so dass es mit dem EGFP fusioniert vorliegt. Zur Vermeidung der Depletion der pEGFP-CtIP-Konstrukte bei einer Anwendung der CtIPsiRNA-Transfektion zur Beseitigung des endogenen CtIP enthält die humane cDNA des CtIPs im Bereich der siRNA-Bindungsstelle 3 stille Mutationen. Ein CtIP-Wildtyp-Konstrukt als auch eine Phosphomutante, bei der ein Austausch des Threonins 847 durch ein nicht phosphorylierbares Alanin stattfand, wurden uns freundlicherweise vom Prof. Dr. S. Takeda (Kyoto, Japan) zur Verfügung gestellt.

Eine Phosphomimik-Mutante, die durch den Austausch von Threonin mit Glutaminsäure an der Position 847 gekennzeichnet ist, wurde durch eine zielgerichtete Mutagenese in dieser Arbeit hergestellt. Diese Mutante stellt ein dauerhaft aktives CtIP dar. Dazu wurde ein *sense* und *antisense* Primer entworfen, die in der Mitte den für die Mutation benötigten Basenaustausch enthielten. Mit diesen Primern und dem CtIP-wt-Plasmid konnte unter ausgewählten Bedingungen eine Mutagenese-PCR durchgeführt werden, bei der ein lineares Mutagenesprodukt entsteht, das die gewünschte Mutation enthalten soll. Der Nachweis der erfolgreichen Mutagenese erfolgte zunächst im Agarosegel. Das entstandene lineare Mutageneseprodukt ist durch eine Bande bei ca. 7500 bp erkennbar, wogegen das zirkuläre Ausgangsplasmid durch eine Doppelbande gekennzeichnet ist (Abb. 4.24. A). Ob das Mutageneseprodukt auch die gewünschte Mutation enthielt, wurde durch eine anschließende Sequenzierung überprüft. Die Expressionsprodukte der verwendeten Plasmide sind in Abb. 4.24. B dargestellt.

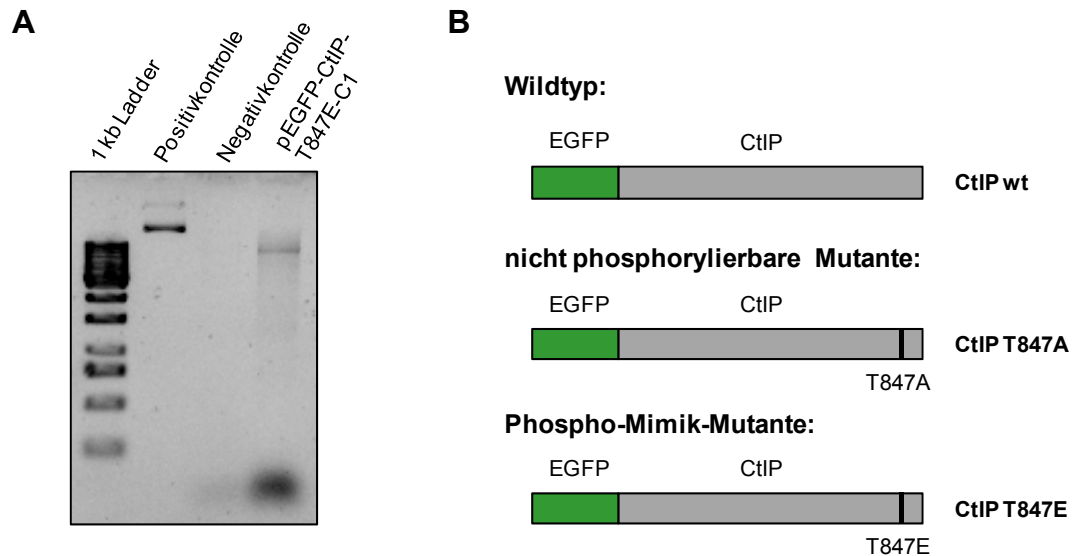


Abb. 4.24. Darstellung der CtIP-Konstrukte

(A) 1 %iges Agarosegel des Mutageneseansatzes. Aufgetragen wurden 5 μ l 1 kb Ladder, 100 ng Ausgangsplasmid (Positivkontrolle) und 10 μ l Mutageneseansatz nach Inkubation mit dem Restriktionsenzym *DpnI*. Mutageneseansatz: pEGFP_CtIP-T847E_C1.

(B) Schematische Darstellung der CtIP-Konstrukte. Gezeigt ist der Wildtyp, die nicht phosphorylierbare Mutante, bei der das Threonin an Position 847 durch Alanin ausgetauscht wurde, und die Phospho-Mimik-Mutante, bei der das Threonin an Position 847 durch Glutaminsäure ersetzt wurde.

Zur Untersuchung der Abhängigkeit der Artemis- und ATM-abhängigen DSBs von der Resektionsfunktion von CtIP wurden HeLa-S3-Zellen zunächst mit Artemis/CtIP- bzw. ATM/CtIP-siRNA transfiziert. Erst 8 h nach siRNA-Transfektion erfolgte die Transfektion mit den verschiedenen CtIP-Konstrukten. Die Transfektion von siRNA und Plasmid erfolgte auf getrennten Wegen, da für eine erfolgreiche Transfektion unterschiedliche Transfektionreagenzien und damit verbunden unterschiedliche Protokolle notwendig waren. Die Zellen wurden 48 h nach siRNA-Transfektion mit 2 Gy bestrahlt, nach Ablauf der Reparaturzeit fixiert und mit spezifischen Antikörpern gegen γ H2AX und GFP gefärbt. Die Quantifizierung der γ H2AX-Foci erfolgte nur in den GFP-positiven und somit transfizierten G2-Zellen (Abb. 4.25. A). Die Unterscheidung der Zellzyklusphasen erfolgte anhand des DNA-Gehalts und des γ H2AX-Signals, wie unter 4.2.1. beschrieben.

Bei der Quantifizierung der γ H2AX-Foci in G2-Zellen fiel auf, dass sich die Anzahl der γ H2AX-Foci zu jedem Zeitpunkt der Reparatur von denen der nur mit siRNA-transfizierten Zellen aus früheren Versuchen unterscheidet. So zeigen die Plasmid-transfizierten HeLa-S3-Zellen 2 h nach Bestrahlung ca. 35 Foci, während HeLa-S3-Zellen, die nur mit siRNA transfiziert wurden, zu diesem Zeitpunkt 45 Foci aufweisen (Abb. 4.22. B). Dies kann auf eine schlechtere Färbung des γ H2AX nach Doppel-

transfektion der Zellen zurückzuführen sein. Die Komplementation mit dem CtIP-wt-Konstrukt führt in der G2-Phase sowohl in den Artemis/CtIP- als auch ATM/CtIP-depletierten Zellen zu einem Reparaturdefekt in der langsamen Komponente der Reparatur. Dies ist durch einen Unterschied von ca. 6 γ H2AX-Foci zu späteren Zeitpunkten (8 h, 10 h) im Vergleich zu Kontrollzellen erkennbar. Dieser Reparaturdefekt ist mit dem in dieser Arbeit gezeigten Defekt durch Depletion von Artemis bzw. ATM in HeLa-S3-Zellen vergleichbar (Abb. 4.13. C). Übereinstimmend mit der Funktion des Threonin 847 für die Resektion ähnelt die γ H2AX-Reparaturkinetik einer mit der Phosphomutante (pEGFP-CtIP-T847A-C1) komplementierten Artemis/CtIP- bzw. ATM/CtIP-depletierten Zelllinie der Kinetik von CtIP-depletierten Zellen. In diesen Zellen ist zu späteren Zeitpunkten eine bessere Reparatur der γ H2AX-Foci im Vergleich zu Kontrollzellen zu beobachten, erkennbar durch einen Unterschied von ca. 3 γ H2AX-Foci. In Artemis/CtIP- bzw. ATM/CtIP-depletierten Zellen führt die Komplementation mit einer dauerhaft aktiven CtIP-Mutante (pEGFP-CtIP-T847E-C1) dagegen erneut zu einem Artemis- bzw. ATM- abhängigen Defekt in der langsamen Komponente der Reparatur in der G2-Phase. Dieser Defekt manifestiert sich in einem Unterschied von ca. 6 Foci (Abb. 4.25. B).

Zusammenfassend verdeutlichen diese Resultate, dass die Entstehung der Artemis- bzw. ATM-Abhängigkeit während der langsamen Reparatur in der G2-Phase auf die Resektionsfunktion von CtIP zurückzuführen ist.

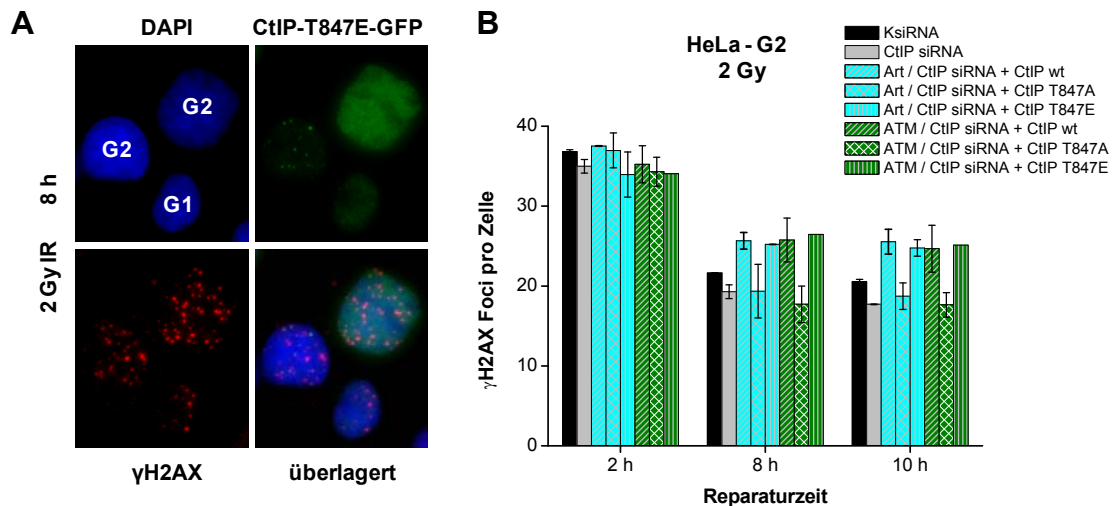


Abb. 4.25. DNA-Reparatur in CtIP-komplementierten Art/ATM-depletierten HeLa-S3-Zellen nach strahleninduzierten Schäden in der G2-Phase

(A) Immunfluoreszenzfärbung einer Art/CtIP-depletierten Zelle komplementiert mit pEGFP-T847E_C1. 48 h nach siRNA- (Art siRNA 15 nM, CtIP siRNA) und Plasmid-Transfektion (pEGFP_CtIP-T847E_C1) wurden HeLa-S3-Zellen bestrahlt (2 Gy + Aphidicolin + Nocodazol). Nach Ablauf der Reparaturzeit (8 h) wurden die Zellen fixiert und gegen GFP (grün) und γH2AX (rot) gefärbt. Die DNA wurde unspezifisch mit DAPI (blau) gegengefärbt. Die Aufnahme erfolgte bei 630facher Vergrößerung.

(B) 48 h nach siRNA- (Art siRNA 15 nM, ATM siRNA 10 nM, CtIP siRNA 50 nM, KsiRNA 20 nM) und Plasmid-Transfektion (pEGFP_CtIP-wt_C1, pEGFP_CtIP-T847A_C1, pEGFP_CtIP-T847E_C1) wurden HeLa-S3-Zellen bestrahlt (2 Gy + Aphidicolin + Nocodazol). Nach Ablauf der Reparaturzeit (2 h, 8 h, 10 h) wurden die Zellen fixiert. Unbestrahlte Zellen wurden identisch behandelt. Nach der γH2AX-Färbung wurden die Foci in GFP-positiven G2-Zellen quantifiziert. Kontrollen von 1,5-3 (G2 γH2AX) wurden substrahiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 Experimenten (mit Ausnahme der ATM/CtIP siRNA + CtIP T847E – HeLa-S3-Zellen). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler zwischen den Experimenten.

4.5.5. Untersuchungen zum Einfluss der Resektion von DSBs auf die Artemis- und ATM-Abhängigkeit nach Transfektion von CtIP-Mutanten in der G1-Phase

In 4.5.3. konnte gezeigt werden, dass auch die Artemis und ATM-Abhängigkeit der langsamen Reparaturkomponente in der G1-Phase von CtIP abhängig ist. Ob auch der Artemis- und ATM-abhängige Reparaturdefekt in der G1-Phase auf die Resektionsfunktion von CtIP zurückzuführen ist, sollte anhand der Transfektion von CtIP-Mutanten untersucht werden. Die HeLa-S3-Zellen wurden, wie unter 4.5.4. beschrieben, transfiziert. In den 82-6hTert-Zellen erfolgte die Transfektion der verschiedenen siRNAs und Plasmide zeitgleich über das Verfahren der Elektroporation, da eine chemische Transfektion auf Basis von DNA-Lipid-Komplexen keine optimale Effizienz erbrachte. Außerdem konnte in den 82-6hTert-Zellen nur eine Auswertung in den G1-Zellen erfolgen, da nicht genügend G2-Zellen GFP-positiv waren. Die Transfektion von Plasmiden in die 82-6hTert-Zellen bedarf daher noch weiterer Optimierungs-

arbeit. Die Bestrahlung, Fixierung und Färbung erfolgte wie oben beschrieben. Die Quantifizierung der γ H2AX-Foci erfolgte in den GFP-positiven G1-Zellen (Abb. 4.26. A). Die Unterscheidung der Zellzyklusphasen erfolgte anhand der Auswertung des DNA-Gehalts und des γ H2AX-Signals, wie unter 4.2.1. beschrieben.

Die Versuche in HeLa-S3- und 82-6hTert-Zellen liefern identische Ergebnisse. Diese sind in Abb. 4.26. B und C dargestellt. Analog zu der Reparatur in der G2-Phase führt die Komplementation mit dem CtIP-wt-Plasmid in Artemis/CtIP- bzw. ATM/CtIP-depletierten Zellen zu einem um 4-5 γ H2AX-Foci erhöhtem Niveau im Vergleich zu Kontrollzellen. Dieser Reparaturdefekt entspricht dem beobachteten Defekt in der langsamen Reparaturkomponente in der G1-Phase von Artemis- und ATM-depletierten Zellen (Abb. 4.13. A). Die Komplementation mit der Phosphomutante (pEGFP-CtIP-T847A-C1) in Artemis/CtIP bzw. ATM/CtIP-depletierten Zellen führt zu einer mit Kontrollzellen vergleichbaren Reparatur. Die Komplementation mit einer Phosphomimik-Mutante (pEGFP-CtIP-T847E-C1) in Artemis/CtIP- bzw. ATM/CtIP-depletierten Zellen resultiert dagegen in einem um 4-5 γ H2AX-Foci erhöhtem Niveau zu den späteren Reparaturzeitpunkten. Die mit der Phosphomimik-Mutante komplementierten Zellen weisen demnach erneut einen Artemis bzw. ATM-abhängigen Reparaturdefekt in der langsamen Komponente auf.

Zusammenfassend besagen die Komplementationsexperimente, dass auch in der G1-Phase die Artemis- und ATM-Abhängigkeit in der langsamen Reparaturkomponente auf die durch CtIP initiierte Anresection der DSBs, die durch Phosphorylierung des CtIP am Threonin 847 beruht, zurückzuführen ist.

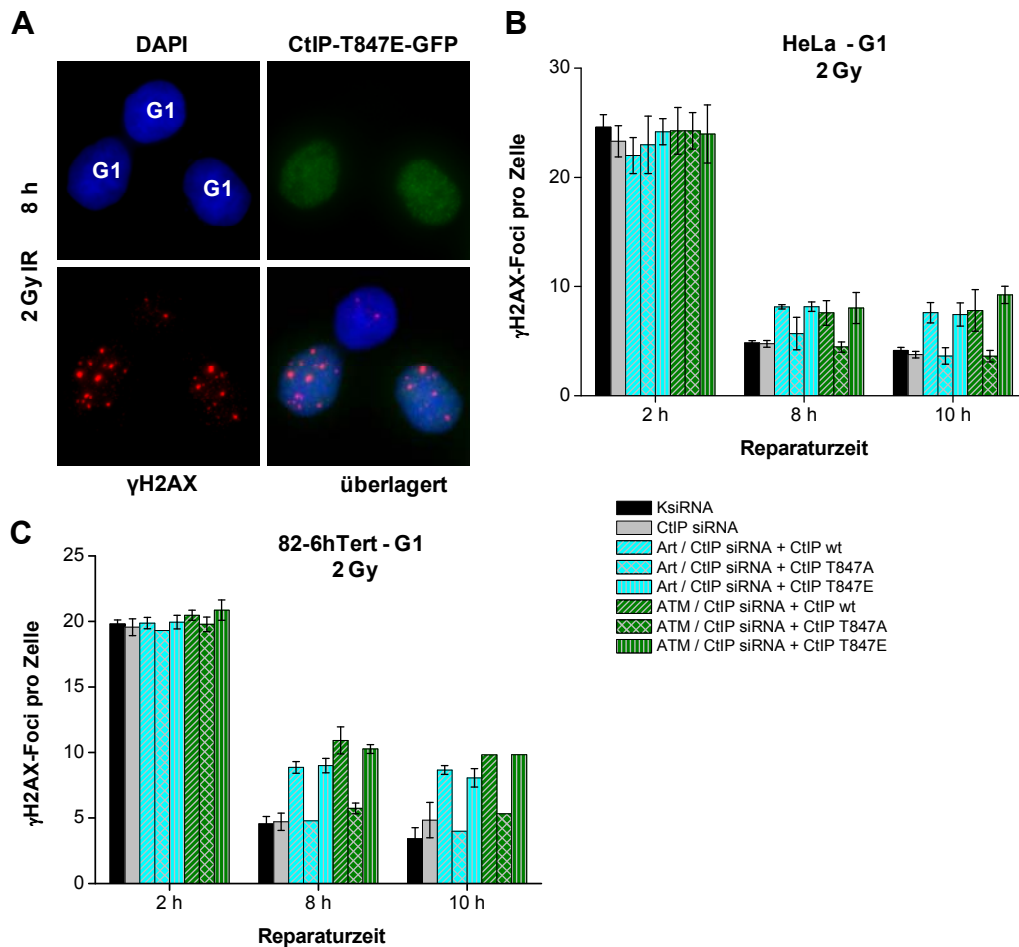


Abb. 4.26. DNA-Reparatur in CtIP-komplementierten Art/ATM-defizienten HeLa-S3-Zellen nach strahleninduzierten Schäden in der G1-Phase

(A) Immunfluoreszenzfärbung einer Art/CtIP-defizienten Zelle komplementiert mit pEGFP-T847E_C1. 48 h nach siRNA- (Art siRNA 15 nM, CtIP siRNA 50 nM) und Plasmid-Transfektion (pEGFP_CtIP-T847E_C1) wurden HeLa-S3-Zellen bestrahlt (2 Gy + Aphidicolin + Nocodazol). Nach Ablauf der Reparaturzeit wurden die Zellen fixiert und gegen GFP (grün) und γH2AX (rot) gefärbt. Die DNA wurde unspezifisch mit DAPI (blau) gegengefärbt. Die Aufnahme erfolgte bei 630facher Vergrößerung.

(B-C) 48 h nach siRNA- (Art siRNA 15 nM, ATM siRNA 10 nM, CtIP siRNA 50 nM, KsiRNA 20 nM) und Plasmid-Transfektion (pEGFP_CtIP-wt_C1, pEGFP_CtIP-T847A_C1, pEGFP_CtIP-T847E_C1) wurden HeLa-S3-Zellen **(B)** und 82-6 hTert-Zellen **(C)** bestrahlt (2 Gy + Aphidicolin + Nocodazol) und nach Ablauf der Reparaturzeit (2 h, 8 h, 10 h, 24 h) fixiert. Als Kontrolle wurden unbestrahlte Zellen identisch behandelt. Nach der γH2AX-Färbung wurden die Foci in GFP-positiven G1-Zellen quantifiziert. Kontrollen von 1,5-3 (G2 γH2AX) wurden abgezogen. Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 Experimenten (mit Ausnahme der ATM/CtIP siRNA + CtIP T847E – 82-6hTert-Zellen). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler zwischen den Experimenten.

4.5.6. Einfluss von Roscovitin auf die Artemis-abhängige Reparatur

Die Phosphorylierung des CtIPs am Threonin 847 erfolgt durch die Cyclin-abhängige Kinase 1 (CDK1), die in der S- und G2-Phase aktiv vorliegt (Ira et al. 2004, Huertas et al. 2008). Entgegen der beschriebenen zellzyklusspezifischen Phosphorylierung des Threonin 847 durch CDK1 konnte neben den G2-Zellen auch in G1-Zellen eine

Notwendigkeit der Phosphorylierung des CtIPs am Threonin 847 beobachtet werden. Zur Klärung ob die Phosphorylierung am Threonin 847 in der G1-Phase auch durch CDKs erfolgt, sollten diese inhibiert werden. Dazu wurden Wildtyp (82-6hTert) und Artemis-defiziente (CJ-hTert) Zellen eine Stunde vor Bestrahlung (2 Gy) bis zum Zeitpunkt der Zellernte mit dem CDK-Inhibitor Roscovitin behandelt. Anschließend wurden die Zellen fixiert und gegen Rad51 und γ H2AX gefärbt und die Foci in der G1- und der G2-Phase quantitativ ausgewertet.

Die Wirksamkeit des Roscovitin wurde durch Messung der Resektion in der G2-Phase anhand der Rad51-Foci-Analyse überprüft. Übereinstimmend mit der Rolle der CDKs für die Resektion von DSBs in der G2-Phase führt die Behandlung von Wildtyp-Zellen zu einer Reduktion in der Ausbildung der Rad51-Foci um ca. 70 % auf ca. 6 Foci. Die Behandlung der Zellen mit Roscovitin scheint demnach die CDKs zu inhibieren. Roscovitin behandelte CJhTert-Zellen zeigen ein ähnliches Ausbleiben der Ausbildung von Rad51-Foci wie die Roscovitin behandelten 82-6hTert-Zellen (Abb. 4.27. A). Die Inhibition der CDKs zeigt keine Auswirkung auf den kinetischen Verlauf der γ H2AX-Foci in Wildtypzellen, wogegen der Artemis-abhängige Reparaturdefekt durch Inhibition der CDKs verringert werden kann, was konform mit der Rolle der CDKs bei der Aktivierung des CtIP für die Resektion der DSBs in der G2-Phase ist (Huertas et al. 2008) (Abb. 4.27. B). Im Gegensatz zur G2-Phase kann in der G1-Phase die Artemis-Abhängigkeit in der langsamen Komponente der Reparatur nicht durch Inhibition der CDKs aufgehoben werden. So zeigen unbehandelte CJhTert-Zellen eine mit unbehandelten CJhTert-Zellen vergleichbare γ H2AX-Kinetik und einen Defekt von 4-5 Foci. Auch eine Erhöhung der Konzentration des Inhibitors Roscovitin auf 25 μ M führt zu keinem Einfluss auf die Reparatur der γ H2AX-Foci (Abb. 4.27. C). Die Phosphorylierung des Threonin 847 in den G1-Zellen erfolgt somit nicht in Abhängigkeit von CDKs.

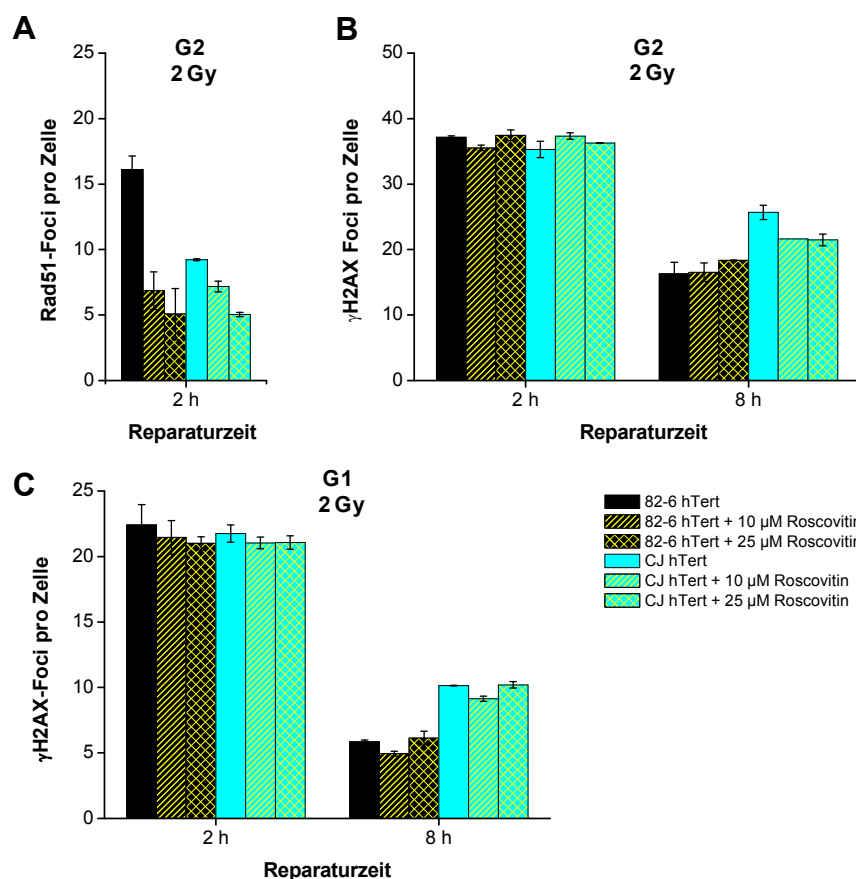


Abb. 4.27. DNA-Reparatur in mit Roscovitin behandelten 82-6hTert- und CJhTert-Zellen

(A-C) γ H2AX- und Rad51-Analyse in mit Roscovitin vorbehandelten und bestrahlten (2 Gy + Aphidicolin + Nocodazol) 82-6hTert- und CJhTert-Zellen. 1 h vor Bestrahlung und während der gesamten Reparaturzeit wurden die Zellen mit Roscovitin behandelt. Nach Ablauf der Reparaturzeit (2 h, 8 h) wurden die Zellen fixiert und spezifisch mit Antikörper gegen Rad51 und γ H2AX gefärbt. Als Kontrolle wurden unbestrahlte Zellen identisch behandelt. Kontrollen von 1,5-3 (G2 γ H2AX), 0,3-0,5 (G2 Rad51) und 0,1-0,3 (G1 γ H2AX) wurden abgezogen. Dargestellt ist der Mittelwert aus 2 Experimenten. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler zwischen den Experimenten.

5. Diskussion

5.1. Funktion von p53 am G2/M-Übergang nach ionisierender Bestrahlung

5.1.1. Einfluss des p53-Status auf den G2/M-Checkpoint

Weltweit leben über 11 Million Menschen mit einem Tumor, der aufgrund einer inaktivierenden Mutation des p53 entstanden ist, und weitere 11 Million entwickeln Tumore, die durch das Außerkraftsetzen von über- oder untergeordneten Komponenten des p53-Signalwegs gekennzeichnet sind (Lane 1992, Brown et al. 2009). Das p53-Protein wird als „Wächter des Genoms“ bezeichnet, da es bei vielen Mechanismen in der Zelle von großer Bedeutung ist. So ist es u.a. bei der Induktion der Apoptose, bei der Regulierung von Proteinen, die an der DNA-Reparatur beteiligt sind, sowie bei der Kontrolle des Zellzyklus involviert. Der p53-Signalweg ist daher ein wichtiger Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Krebsmedikamente. Doch zur Entwicklung effektiver Medikamente ist die exakte Aufklärung der verschiedenen Funktionen von p53 von großer Bedeutung. Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Funktion von p53 in der Zellzykluskontrolle. Bisherige Studien beschäftigten sich hauptsächlich mit der Funktion von p53 beim G1/S-Checkpoint. Dabei konnte gezeigt werden, dass nach strahleninduzierten DNA-Schäden in einem p53-defizienten Hintergrund ein Verlust des G1/S-Checkpoints beobachtet wird. Demnach ist das p53-Protein für die Initiation des G1/S-Checkpoints von Bedeutung (Kastan et al. 1992, Kuerbitz et al. 1992).

Der Einfluss des p53-Proteins auf den zweiten wichtigen Checkpoint des Zellzyklus, am G2/M-Übergang, wird dagegen in der Literatur kontrovers diskutiert. So ist beschrieben, dass p53-defiziente Blasenkrebszellen (EJ) nach oxidativen Stress, der durch Behandlung mit organischem Hydroperoxid induziert wurde, einen verlängerten G2-Arrest aufweisen (Macip et al. 2006). Im Gegensatz dazu wiesen Bunz et al. (1998) nach, dass die Behandlung von p53-defizienten Kolonkarzinomzellen mit 12 Gy γ -Bestrahlung zunächst einen G2/M-Checkpoint induziert, die Zellen aber nach einer gewissen Zeit in die Mitose übergehen. Weiterhin konnten Bunz et al. (1998) zeigen, dass im Anschluss an die Zellteilung p53-unabhängig Apoptose eingeleitet wird. In Bezug auf die Einleitung der Apoptose in einem p53-defizienten Hintergrund legten Strasser-Wozak et al. (1998) dar, dass die Reaktion p53-defizienter Zellen von der Strahlendosis abhängig ist. So wurde in diesen Studien gezeigt, dass Strahlendosen von 0,75-1,5 Gy nicht ausreichen um die Apoptose zu induzieren, während Strahlendosen von 3-12 Gy zur vermehrten Induktion der p53-unabhängigen Apop-

tose führten. Es ist somit denkbar, dass in Abhängigkeit vom induzierten Schadensniveau p53 eine andere Funktion ausübt.

In der vorliegenden Arbeit sollen daher mögliche Funktionen von p53 beim G2/M-Checkpoint nach ionisierender Bestrahlung genauer untersucht werden. Dazu wurden durchflusszytometrische Methoden zur Messung des mitotischen Index anhand des pH3-Signals (Abb. 4.1.) als auch proteinanalytische Methoden zur Analyse von Proteinen, die am G2/M-Checkpoint beteiligt sind, (Abb.4.5.) angewandt. Bestätigend zu der Arbeit von Bunz et al. (1998) konnte auch in der vorliegenden Arbeit in p53-defizienten Zellen nach Applikation einer Strahlendosis von 12 Gy ein Wiedereintritt in den Zellzyklus beobachtet werden, während p53wt Zellen im G2-Arrest verbleiben (Abb. 4.3.). Weiterhin zeigte sich, dass in p53-defizienten Zellen der Zelltod nach einer Strahlendosis von 12 Gy eingeleitet wird (Abb. 4.4.). Anhand der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente kann jedoch keine Aussage darüber getroffen werden, ob die in die Mitose übergegangenen Zellen auch diejenigen sind, in denen es zur Einleitung des Zelltods kommt. Der beobachtete Zelltod ist jedoch mit den Untersuchungen von Strasser-Wozak et al. (1998) konsistent. Im Gegensatz zu einer Strahlendosis von 12 Gy führt die Bestrahlung mit 1 Gy in p53-defizienten Zellen zu einem verlängerten G2-Arrest im Vergleich zu p53wt Zellen (Abb. 4.1.). Die Funktion des p53-Proteins am G2/M-Checkpoint scheint somit vom induzierten DNA-Schadensniveau abhängig zu sein. Bei einem erhöhten Schadensniveau übernimmt das p53-Protein eine Aufgabe bei der Aufrechterhaltung des G2-Arrests, während bei einem geringeren DNA-Schadensniveau p53 eine gegensätzliche Funktion bei der Aufhebung des G2/M-Checkpoints auszuüben scheint.

Bei den Untersuchungen des G2/M-Checkpoints fiel weiterhin auf, dass der Verlust von p53 nur zu einem moderaten Absinken des mitotischen Index führt, wohingegen in p53wt Zellen eine nahezu vollständige Initiation des G2/M-Checkpoints zu beobachten ist. Auch eine Erhöhung der applizierten Strahlendosis führte in p53-/- Zellen nicht zu einem vollständigen G2-Arrest (Abb. 4.1.). Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass die Initiation des G2/M-Checkpoints vom p53-Status abhängig ist. Allerdings bleibt das partielle Niveau des mitotischen Index im gesamten Beobachtungszeitraum konstant. Es könnte daher möglich sein, dass infolge der Bestrahlung eine Verlangsamung des G2/M-Übergangs induziert wird. Weiterhin treten Zellen in die Mitose und gleich viele Zellen verlassen die Mitose, so dass es zu einem Gleichgewicht zwischen Ein- und Austritt in die bzw. aus der Mitose kommt, ohne dass dies

mit der angewandten Methode erfasst werden kann. Dieses Gleichgewicht könnte das partielle Absinken des mitotischen Index und das gleichbleibende Niveau erklären. Diese Hypothese wurde überprüft, in dem das Verlassen der Mitose durch Inhibition der Ausbildung des Spindelapparates mit Nocodazol unterbunden wurde. Überraschenderweise konnte kein Übertritt der p53-defizienten Zellen beobachtet werden (Abb. 4.2.). Somit konnte die Annahme eines Gleichgewichts zwischen Ein- und Austritt in die bzw. aus der Mitose in Abwesenheit von p53 widerlegt werden. Vielmehr scheint in p53-defizienten Zellen auch nach IR ein vollständiger G2/M-Checkpoint induziert zu werden. Unter Berücksichtigung des moderaten Absinkens des mitotischen Index könnte ein in der Mitose initiiertes Checkpoint denkbar sein. Diese Vermutung wird in verschiedenen Studien, in denen ein durch DNA-Schäden-induzierter Checkpoint in der Mitose postuliert wurde (Mikhailov et al. 2002, Tanno et al. 2006), unterstützt. Das Einsetzen des mitotischen Arrests ist dabei unabhängig vom p53-Status (Sablina et al. 1999, Mikhailov et al. 2002, Chow et al. 2003). In p53wt Zellen scheint das Einsetzen des mitotischen Checkpoints vielmehr von der Höhe des induzierten DNA-Schadens abhängig zu sein (Tanno et al. 2006). Tanno et al. zeigten, dass die mit einem Mikrobeam und einer Strahlendosis von 1 Gy induzierten DNA-Schäden keinen Einfluss auf die Dauer der Mitose haben, während die nach 4 oder 20 Gy induzierten DNA-Schäden zu einer verlängerten Mitose führen (Tanno et al. 2006). Im Gegensatz dazu ist der Austritt aus der Mitose p53-abhängig. Eine Folge der verlängerten Mitose ist die Akkumulation von p53, die nachweislich den Austritt aus der Mitose fördert (Baek et al. 2003, Vogel et al. 2004, Blagosklonny 2006). Die verbleibenden DNA-Schäden führen in der folgenden G1-Phase zu einem Arrest, während dem die Reparatur ablaufen kann. Die fehlende p53-Funktion in p53-defizienten Zellen könnte demnach einen Austritt aus der Mitose verzögern. Dieser Arrest ist für die Zelle sogar von Vorteil, da in einem p53-defizienten Hintergrund kein G1/S-Checkpoint induziert werden kann, der eine Reparatur der verbliebenen DNA-Schäden ermöglicht.

5.1.2. Einfluss von p53 auf die am G2/M-Übergang beteiligten Proteine Cdc25C und Plk1

Das Aufrechterhalten des G2/M-Checkpoints in p53-defizienten Zellen sollte ebenfalls durch proteinanalytische Methoden untersucht werden. Dabei stand die Phos-

phatase Cdc25C, die eine zentrale Rolle beim Übergang von der G2-Phase in die Mitose spielt (Draetta and Eckstein 1997), im Mittelpunkt der Untersuchungen.

Bereits die Gesamtproteinmenge des Cdc25Cs scheint von p53 abhängig zu sein. So konnte in unbehandelten p53^{-/-} Zellen eine erhöhte Cdc25C-Proteinmenge verglichen mit p53^{wt} Zellen nachgewiesen werden (Abb. 4.4. A). Dies kann auf die beschriebene, reprimierende Funktion von p53 auf mRNA- und Proteinebene des Cdc25Cs zurückzuführen sein. Diese Funktion wird durch eine hohe Affinität des p53-Proteins an das im Promotor des Cdc25C enthaltende CDE/CHR-Element manifestiert (Resnick-Silverman et al. 1998, St. Clair et al. 2004).

Weiterhin sollte der Phosphorylierungsstatus von Cdc25C genauer betrachtet werden, denn als Antwort auf DNA-Schäden erfolgt die Inaktivierung des Cdc25C durch Phosphorylierung des Serins 216, welche durch die Chk1/2 vermittelt wird. Infolge der Phosphorylierung bindet das 14-3-3-Protein an Cdc25C und bewirkt den Transport aus dem Zellkern in das Zytoplasma (Peng et al 1997, Chan et al. 1999, Bulavin et al. 2003). Bestätigend zu den Ergebnissen des mitotischen Index konnte durch den Anstieg der Phosphorylierung des Cdc25C (Ser216) das Einsetzen des G2/M-Checkpoints nachgewiesen werden (Abb. 4.5. B, C). Da dies sowohl in p53^{wt} als auch in p53-defizienten Zellen beobachtet werden konnte, scheint die Phosphorylierung des Cdc25C am Serin216 unabhängig von p53 zu erfolgen. Jedoch scheint die Dephosphorylierung des Cdc25s am Serin 216 in Abhängigkeit von p53 zu erfolgen. Denn so konnte in p53^{wt}-Zellen eine Abnahme des p-Cdc25C (Ser216) zu späteren Zeitpunkten nachgewiesen werden, was mit dem Zeitpunkt des Aufhebens des G2/M-Checkpoints korreliert. In einem p53-defizienten Hintergrund steigt die Menge des phosphorylierten Cdc25C (Ser216) stetig an, was wiederum den andauernden G2-Arrest bekräftigt.

Bisher wurde eher indirekt die Inaktivierung der Cdc25C anhand von Phosphorylierungen untersucht, da es sich bei Cdc25C aber um eine Phosphatase handelt, die den Eintritt in die Mitose durch Dephosphorylierung von CDK1 am Threonin 14 und Tyrosin 15 vermittelt (Morgan 1995, Le Gac et al. 2006), beschäftigt sich der folgende Abschnitt mit einem möglichen Einfluss von p53 auf die Enzymaktivität der Phosphatase, Cdc25C. In unbehandelten p53-defizienten Zellen konnte eine verminderte Enzymaktivität des Cdc25C im Vergleich zu Wildtypzellen nachgewiesen werden (Abb. 4.5. F), obwohl ein erhöhtes Niveau der Gesamtproteinmenge des Cdc25Cs beobachtet wurde (Abb. 4.5. A). Dies spricht dafür, dass das überschüssige Cdc25C

in einem p53-defizienten Hintergrund überwiegend in seiner inaktiven, phosphorylierten Form vorliegt. Die Phosphataseaktivität des Cdc25C nimmt dagegen unabhängig vom p53-Status nach IR-induzierten DSBs innerhalb der ersten Stunde ab, was mit dem Einsetzen des G2/M-Checkpoints einhergeht. Mit dem Wiedereintritt in den Zellzyklus nach einer applizierten Strahlendosis von 1 Gy kann ein Anstieg der Phosphataseaktivität in p53-profizienten Zellen beobachtet werden, während in p53-defizienten Zellen die Enzymaktivität des Cdc25C nicht wieder ansteigt und so den anhaltenden G2-Arrest bekräftigt (Abb. 4.5. E). Daraus resultiert die Möglichkeit, dass p53 tatsächlich bei der Reaktivierung der Enzymaktivität des Cdc25C involviert ist.

Ein entscheidender Schritt bei der Reaktivierung des Cdc25C ist der Rücktransport in den Zellkern. Dieser Prozess beruht auf der Phosphorylierung der Kernexportsequenz von Cdc25C am Serin 198 durch die Polo-like-Kinase 1 (Plk1) (Toyoshima-Morimoto et al. 2002). In der vorliegenden Arbeit konnte bereits in unbehandelten p53-depletierten Zellen eine erhöhte Proteinmenge an Plk1 im Vergleich zu Wildtypzellen nachgewiesen werden (Abb. 4.5. E). Die Identifizierung eines CDE/CHR-Elements im Promotor des Plk1-Gens, an das das p53-Protein binden kann (Incassati et al. 2006, Müller und Engeland 2010), könnte eine p53-vermittelte Repression der Plk1 erklären. Zeitgleich zu den von mir durchgeführten Untersuchungen konnten Sur et al. (2008) ebenfalls die p53-abhängige Repression der Plk1 postulieren. Nach Applikation einer Strahlendosis von 1 Gy kann in p53wt Zellen zu einem Zeitpunkt, an dem in anderen Experimenten ein Aufheben des G2/M-Checkpoints gezeigt wird, ein Anstieg der Plk1-Proteinmenge beobachtet werden (Abb. 4.5. E). Da für die Plk1 eine Rolle beim Übergang aus der G2-Phase in die Mitose beschrieben ist (Golsteyn et al. 1995), könnte der Anstieg der Proteinmenge der Plk1 den Eintritt in die Mitose bewirken. Im Gegensatz dazu bestätigt die gleichbleibende Plk1-Proteinmenge den anhaltenden G2-Arrest in p53-defizienten Zellen. Jedoch widerspricht die beobachtete erhöhte Gesamtproteinmenge der Plk1 in p53-defizienten Zellen dem anhaltenden G2-Arrest. Dies könnte jedoch durch die Funktion der Plk1 auf ein p53-verwandtes Protein, das p73, in einem p53-defizienten Hintergrund erklärt werden. Das p73-Protein ist für den Austritt aus der Mitose von großer Notwendigkeit (Merlo et al. 2005). Die Regulation des p73-Proteins erfolgt dabei über die Phosphorylierung des Threonins 27, welches durch die Plk1 vermittelt wird. Diese Phosphorylierung führt zur Inhibierung des p73 (Soond et al. 2008) und somit zur Verhinderung des

Austritts aus der Mitose. Das p73-Protein kann in Abwesenheit von p53 ebenfalls die Apoptose nach Induktion von strahleninduzierten DNA-Schäden auslösen (Rana et al. 2010). Auch diese Funktion von p73 wird durch die Plk1 reguliert. So konnte für die Plk1 in einem p53-defizienten Hintergrund eine große Bedeutung auf das Überleben der Zellen nach strahleninduzierten DNA-Schäden in der Literatur beschrieben werden (Sur et al. 2008), dass im selben Jahr von Koida et al. (2008) durch Einfluss der Plk1 auf die Inhibierung des Zelltods konkretisiert wurde. Die inhibierende Wirkung der Plk1 auf das p73-Protein und das daraus resultierende Unterbinden des Austritts aus der Mitose sowie der Einleitung der Apoptose könnten den andauernden G2-Arrest bekräftigen.

5.1.3. Einfluss von p53 auf die Checkpointkinasen (Chk1/Chk2)

Der vorherige Abschnitt beschäftigt sich mit einer möglichen Funktion von p53 auf die Proteine, die den Übergang in die Mitose ermöglichen. Es ist ebenso vorstellbar, dass das p53-Protein einen Einfluss auf Proteine der frühen DNA-Schadensantwort hat. Mit dieser Annahme befasst sich der nun folgende Abschnitt.

Nach Induktion von DNA-Schäden wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, wobei eines der ersten Signale von den Checkpointkinasen Chk1/Chk2 ausgeht (Jurvensuu et al. 2007). Im Fall der Chk1 ist beschrieben, dass sie für die Initiation des G2-Arrests in p53-defizienten Zellen nach unterschiedlichen Behandlungen, wie *Reactive Oxygen Species* (ROS), IR und *Diammineplatinum(II)dichloride* (DDP), verantwortlich ist (Macip et al. 2006, Carrassa et al. 2004). Im Zuge dieser Doktorarbeit wurde ebenfalls eine mögliche Rolle der Checkpointkinasen auf das Aufrechterhalten des G2-Arrests untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass sowohl die Aktivierung von Chk2 durch ATM als auch die Aktivierung von Chk1 durch ATR für die Aufrechterhaltung des G2-Arrests vonnöten ist. So führt bereits die Depletion einer dieser beiden Checkpointkinasen zum frühzeitigen Aufheben des G2-Arrests (Diese Daten sind in der vorliegenden Arbeit nicht dargestellt, wurden jedoch zur Veröffentlichung eingereicht). Die hier nachgewiesene Funktion der Chk1/Chk2 bei der Aufrechterhaltung des G2-Arrests führte zu der Frage, ob das p53-Protein den Wiedereintritt in den Zellzyklus nach Applikation einer Strahlendosis von 1 Gy durch Eingreifen auf Ebene der Checkpointkinasen ermöglicht.

Durch Phosphorylierung am Serin 317 und 345 wird die Chk1 nach dem induzierten Schaden aktiviert (Lui et al. 2000) und führt zur Phosphorylierung des Cdc25Cs am

Serin 216 (Peng et al 1997, Chan et al. 1999). In dieser Arbeit konnte sowohl auf Ebene des mitotischen Index als auch auf Ebene der inaktivierenden bzw. aktivierenden Phosphorylierung von Cdc25C (Ser216 und Ser198) gezeigt werden, dass die Inhibition von Chk1/2 nach Induktion des G2/M-Checkpoints zur Aufhebung des G2-Arrests in einem p53-defizienten Hintergrund führt. So ist ein Anstieg des mitotischen Index sowie der Proteinmenge des aktiv, phosphorylierten Cdc25Cs (Ser198) zu beobachten, während die inaktive, phosphorylierte Form des Cdc25C (Ser216) zum gleichen Zeitpunkt deutlich abnimmt (Abb. 4.6.). Somit kann konsistent mit den zur Veröffentlichung eingereichten Daten eine Funktion von Chk1/2 bei der Aufrechterhaltung des G2/M-Checkpoints angenommen werden. In Abwesenheit von p53 scheint diese Funktion von Chk1/Chk2 erhalten zu bleiben. Ein Hinweis auf ein mögliches Eingreifen von p53 auf Ebene der Checkpointkinasen lieferten bereits Jurvansuu et al. (2007). In deren Studien wird ein zweistufiger Ablauf der DNA-Schadensantwort postuliert. Im ersten Schritt nach Induktion des DNA-Schadens erfolgt zunächst die Aktivierung von Chk1, die durch Inaktivierung von Cdc25C den Übergang in die Mitose verhindert. An diese schnelle Schadensantwort schließt sich eine langsame Antwort an, die auf der p53-abhängigen Repression von Proteinen, die am G2/M-Übertritt beteiligt sind, beruht. Bereits 2001 konnte für das p53-Protein 6 h nach DDP-induzierten DNA-Schäden eine reprimierende Wirkung auf die Chk1 beschrieben werden (Damia et al. 2001). Auch die Behandlung von p53-transfizierten Zellen mit Etoposid führt zu einer Verminderung der Chk1-Proteinmenge, als dessen Folge ein Aufheben des G2-Arrest beobachtet werden konnte (Cummings et al. 2002). Es ist somit denkbar, dass in einem p53-defizienten Hintergrund nur die schnelle DNA-Schadensantwort erfolgen kann. Ein Ausbleiben der Repression der Chk1 durch das p53-Protein könnte zu einem anhaltenden Schadenssignal führen, das den Wiedereintritt der p53-defizienten Zellen in den Zellzyklus verhindert. In p53wt Zellen scheint die p53-vermittelte Repression der Chk1 einen frühzeitigen Austritt aus der G2-Phase vergleichen mit p53-defizienten Zellen herbeizuführen.

5.1.4. Die Rolle von p53 bei der Reparatur strahleninduzierter Doppelstrangbrüche

Das Checkpointverhalten einer Zelle steht oft im engen Zusammenhang mit dessen Reparaturverhalten. So ist in der Literatur beschrieben, dass in Zellen, die einen Defekt im NHEJ aufweisen, ein verlängerter G2-Arrest beobachtet werden kann. Ein

Beispiel ist die DNA-PK, die bei der Reparatur von DSBs über das NHEJ nach strahleninduzierten Schäden benötigt wird. Die Inhibition der katalytischen Untereinheit der DNA-PK führt nach ionisierender Bestrahlung zu einem verlängerten G2-Arrest (Sturgeon et al. 2006, Arlander et al. 2008). Auch eine Ku80-Defizienz, eine Komponente des DNA-PK-Komplexes, führt nach Behandlung mit H_2O_2 zu einem verlängerten G2-Arrest (Arrington et al. 2000). Das Zusammenspiel von Checkpoint- und Reparaturverhalten könnte somit auch in p53-defizienten Zellen eine Erklärung des anhaltenden G2-Arrests liefern, da das p53-Protein in den Checkpoint und die Reparatur einer Zelle eingreifen könnte. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit auch das Reparaturvermögen der p53-defizienten Zellen näher betrachtet werden.

5.1.4.1. Charakterisierung von NHEJ und HR

Um einen besseren Einblick in die Reparatur p53-defizienter Zellen zu bekommen, ist es von Vorteil, die hier verwendete γ H2AX-Foci-Analyse zunächst an bekannten Reparaturproteinen zu überprüfen. Die Messung der Reparatur beruht auf einer frühen Antwort auf die induzierten DSBs, bei der eine spezifische Phosphorylierung des H2AX am Serin 139, genannt γ H2AX, erfolgt (Rogakou et al. 1998, Burma et al. 2001). Die Quantifizierung der Reparatur erfolgt über das Auftreten diskreter Foci nach Phosphorylierung des H2AX, dabei entspricht jeder Focus einem DSB (Rothkamm und Löbrich 2003, Kinner et al. 2008, Löbrich et al. 2010). In der Literatur ist für DSB-Reparatur ein biphasisches Verhalten beschrieben. Dieses ist innerhalb der ersten Stunden durch eine Reparatur mit einer schnellen Kinetik gekennzeichnet, während zu späteren Zeitpunkten die Reparatur mit einer langsamen Kinetik abläuft (Löbrich et al. 1995, Iliakis et al. 2004). Die Mehrheit der induzierten DSBs in der G1- und der G2-Phase wird mit der schnellen Kinetik über das NHEJ repariert. Die Reparatur der Minderheit der induzierten DSBs mit der langsamen Kinetik unterscheidet sich in der G1- und der G2-Phase. So handelt es sich in der G2-Phase um die HR (Beucher et al. 2009), während in der G1-Phase ein alternativer NHEJ-Weg angenommen wird (Riballo et al. 2004). In dieser Arbeit konnte in HeLa-S3-Zellen bestätigt werden, dass die Reparaturkinetik der strahleninduzierten DSBs einen charakteristischen Verlauf aufweist, der innerhalb der ersten Stunden durch eine schnelle Reparatur der DSBs und in den späten Stunden durch eine langsame Reparatur der DSBs gekennzeichnet ist (Abb. 4.7. D). Zur Überprüfung der γ H2AX-Methode wurden die HeLa-S3-Zellen zusätzlich mit siRNA, spezifisch für bekannte Reparaturpro-

teine, transfiziert. So konnte in einer NHEJ-Mutante (Ku80) ein Reparaturdefekt in der schnellen Komponente in G1 und G2 beobachtet werden, während HR-Mutanten wie Brca2 und Rad51 nur einen Defekt in der langsamen Reparatur der G2-Phase aufzeigen (Abb. 4.8.). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die γ H2AX-Foci-Analyse eine geeignete Methode für die Zuordnung eines untersuchten Proteins in einen Reparaturweg darstellt. Somit kann diese Methode auch Einblicke in eine mögliche Funktion von p53 bei der DNA-Reparatur gewähren.

Bei der Anwendung der γ H2AX-Foci-Analyse werden sowohl die HR- als auch NHEJ-abhängigen Reparaturereignisse gemessen. Um jedoch einen Einfluss von p53 auf die HR genauer untersuchen zu können, wurde in dieser Arbeit eine HR-spezifische Nachweismethode, die Rad51-Foci-Analyse, etabliert. Eine Schlüsselrolle bei der Wahl des Reparaturweges scheint der Prozessierung der DSB-Enden zuzukommen, da für den Ablauf der HR die Resektion der DSBs notwendig ist. Die dabei frei werdenden einzelsträngigen DNA-Bereiche werden mit RPA beladen und dadurch stabilisiert. Anschließend kann Rad51 mit Hilfe von Brca2 anstelle des RPA auf die einzelsträngige DNA übertragen werden und die Homologiesuche kann erfolgen (Fillipo et al 2008). Da die resektierten DSBs der Ausgangspunkt für die HR sind, die nur in der S- und G2-Phase stattfindet (Rothkamm et al. 2003, Shrivastav et al. 2008), ist es nicht weiter verwunderlich, dass in der vorliegenden Arbeit Rad51-Foci nur in der S- und G2-Phase beobachtet werden können (Abb. 4.10. A). Darüber hinaus zeigt sich in dieser Arbeit, dass Brca2-depletierte Zellen einen Defekt in der Ausbildung der Rad51-Foci aufweisen (Abb. 4.11.). Diese Beobachtung ist mit der postulierten Rolle von Brca2 bei der Beladung der ssDNA mit Rad51 erklärbar (Fillipo et al. 2008). In einer NHEJ-Mutante (Ku80) konnte dagegen weiterhin eine normale Ausbildung der Rad51-Foci beobachtet werden (Abb. 4.11.). Dies ist konsistent damit, dass NHEJ-Mutanten in der Lage sind DSBs über die HR zu beseitigen (Clerici et al. 2008). All diese Kontrollen bestätigen die Spezifität der Rad51-Foci-Analyse als indirekten Nachweis der bei der HR benötigten Resektion der DSBs. Somit eignet sich die Methode ebenfalls zur Untersuchung der HR in p53-defizienten Zellen.

5.1.4.2. Der Einfluss von p53 auf die Reparatur strahleninduzierter DSBs

Für das p53-Protein konnte in dieser Arbeit eine Funktion bei dem Wiedereintritt in den Zellzyklus nach einer applizierten Strahlendosis von 1 Gy beschrieben werden. Da ein verlängerter G2-Arrest oftmals durch einen Reparaturdefekt bedingt ist, soll im

Folgenden der Einfluss von p53 bei der Reparatur strahleninduzierter DSBs näher betrachtet werden. Hinweise, dass p53 in die DNA-Reparatur von IR-induzierten DNA-Schäden involviert sein könnte, lieferte Rashid et al. (2005). In diesen Studien wurde gezeigt, dass nach IR-induzierten DNA-Schäden das p53-Protein am Serin 15 phosphoryliert wird und anschließend am DSB akkumuliert. Die dadurch visualisierbaren p53-Foci kolokalisieren mit γ H2AX-Foci und weisen weiterhin eine mit γ H2AX-Foci vergleichbare Reparaturkinetik auf (Rashid et al. 2005). Bisher beschäftigte sich die Arbeit hauptsächlich mit der transkriptionellen Wirkung von p53 auf andere Proteine, doch die Studien von Rashid et al. (2005) werfen die Frage auf, ob das p53-Protein auch direkt in die Reparatur eingreifen kann.

Sowohl in der G1- als auch der G2-Phase von p53-defizienten Zellen konnte ein mit p53wt vergleichbarer Verlauf der Reparaturkinetik von γ H2AX-Foci beobachtet werden (Abb. 4.9.). Demnach scheint weder das NHEJ noch die HR von p53 abhängig zu sein. Auffällig bei der Untersuchung der γ H2AX-Foci-Analyse ist jedoch das leicht erhöhte Niveau an γ H2AX-Foci in p53-defizienten Zellen verglichen mit Wildtypzellen, das sowohl in der G1- als auch in der G2-Phase auftritt (Abb. 4.9.). Neueste Studien von Moon et al. (2010) stellen eine *wildtype p53-induced phosphatase 1* (WIP1) vor, die für die Dephosphorylierung von γ H2AX am Serin 139 benötigt wird. Die Depletion von WIP1 führt in verschiedenen Zelllinien zu einer erhöhten Ausbildung von γ H2AX-Foci nach ionisierender Bestrahlung. Weiterhin zeigen sie, dass WIP1 in einem p53-defizienten Hintergrund nicht exprimiert werden kann. Es ist daher nicht abwegig anzunehmen, dass das erhöhte γ H2AX-Foci-Niveau auf ein Unterbinden der Dephosphorylierung des γ H2AX aufgrund der fehlenden WIP1 zurückzuführen ist. Allerdings sollte die Einschränkung der Dephosphorylierung von γ H2AX persistierende Foci zur Folge haben, was allerdings nicht nachgewiesen werden konnte. Dies ist nicht weiter erstaunlich, da der Phosphatase WIP1 nur eine Funktion bei der Verminderung der DNA-Schadensantwort zugeschrieben werden kann (Moon et al. 2010), während γ H2AX nach erfolgter Reparatur durch die Phosphatasen PP2A und PP4 dephosphoryliert wird (Chowdhury et al. 2005, Nakada et al. 2008).

Anhand der γ H2AX-Foci-Analyse konnte kein Einfluss von p53 bei der Reparatur der DSBs postuliert werden. Die Betrachtung der resektierten DSBs anhand der Rad51-Foci-Analyse ließ jedoch die Vermutung zu, dass das p53-Protein eine negative Wirkung auf die HR ausübt. So zeigt sich in dieser Arbeit, dass Zellen ohne p53 eine erhöhte Ausbildung von Rad51-Foci aufweisen, was für ein erhöhtes Ausmaß an Re-

sektion der DSBs spricht (Abb. 4.12.). Diese unterdrückende Funktion von p53 wurde bereits in der Literatur beschrieben. Einen Hinweis lieferten Arias-Lopez et al. (2006), die die Bindung von p53 an ein *p53 response element* im Promotor des Rad51 postulieren. Sie konnten weiterhin nachweisen, dass diese Bindung von p53 eine Repression von Rad51 auf mRNA- und Proteinebene zur Folge hat. Arias-Lopez et al. stellten somit die Hypothese auf, dass die transkriptionelle Repression von Rad51 das Ausmaß der HR beeinflussen kann. Aber auch andere Veröffentlichungen beschreiben für das p53-Protein eine unterdrückende Funktion auf die HR (Bakalkin et al. 1994, Gebow et al. 2000, Akyüz et al. 2002). Dabei soll das p53-Oligomer an kurze (36-76nt) einzelsträngige DNA-Bereiche von unreparierten DSBs binden und so die Anlagerung der einen ssDNA an die komplementäre ssDNA unterstützen, was die Reparatur der DSBs fördert (Bakalkin et al. 1993, Gebow et al. 2000, Akyüz et al. 2002). In einem p53-defizienten Hintergrund verbleiben diese Brüche nun unrepariert und bilden den Startpunkt für die HR. Damit übereinstimmend konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass der kinetische Verlauf der Rad51-Foci nicht beeinflusst ist (Abb. 4.12.). Somit scheinen auch in einem p53-defizienten Hintergrund die resektierten DSBs repariert zu werden. Dies geschieht nach Bakalkin et al. und Gebow et al. über die HR. Im Widerspruch dazu stehen die Studien von Orre et al. (2006). Diese besagen, dass resektierte DSBs in einem p53-defizienten Hintergrund nicht repariert werden, während in p53wt-Zellen die Reparatur erfolgen kann. Ein entscheidender Unterschied zwischen den Studien von Orre et al. und der hier vorliegenden Arbeit ist die applizierte Strahlendosis. So behandelten Orre et al. ihre Zellen mit 12 Gy, während in der vorliegenden Arbeit nur 2 Gy appliziert wurden. Dies lässt den Schluss zu, dass in einem p53-defizienten Hintergrund neben dem unter 5.1.1. beschriebenen Checkpointverhalten auch das Reparaturverhalten bei resektierten DSBs vom induzierten Schadensniveau abhängig ist.

Für das p53-Protein kann zwar eine unterdrückende Funktion auf die HR angenommen werden, es gibt jedoch keinen Hinweis auf einen Reparaturdefekt in p53-defizienten Zellen, der den verlängerten G2-Arrest erklären könnte. In jüngeren Studien konnte beschrieben werden, dass in Wildtypzellen trotz unreparierter DNA-Schäden der G2/M-Checkpoint aufgehoben wird. Dabei konnte ein Schwellenwert von 20-30 unreparierten DSBs manifestiert werden (Deckbar et al. 2007). Auch in der vorliegenden Arbeit verbleiben 20-30 DSBs im beobachteten Zeitraum unrepariert. Trotzdem verharren die Zellen zu diesem Zeitpunkt weiterhin in der G2-Phase

(Abb. 4.9.). Vielleicht existiert in Abwesenheit von p53 kein Schwellenwert und vor dem Übertritt in die Mitose müssen alle DSBs repariert werden, da die sonst in der G2-Phase unrepariert verbliebenden DSBs aufgrund des fehlenden G1/S-Checkpoint nicht in der anschließenden G1-Phase repariert werden können. Eine möglichst gute Reparatur in der G2-Phase scheint daher von großer Bedeutung zu sein, denn der G2/M-Checkpoint scheint somit eine Art Notbremse zu sein, die eine ungewollte Proliferation nach einer Strahlendosis von 1Gy verhindert. Es darf jedoch nicht vergessen werden, dass im Normalzustand einer Zelle das p53-Protein in seiner Wildtypform vorliegt und Mutationen in diesem Protein eigentlich nicht vorgesehen und dazu noch gefährlich sein können. Für die Eliminierung einer Zelle ohne p53wt wäre es daher von Vorteil trotz vieler Schäden weiter zu laufen, damit Apoptose eingeleitet werden kann. Trotzdem gibt es erste Hinweise dafür, dass in Abwesenheit von p53 der G2/M-Checkpoint an Bedeutung zunimmt. So konnte in TKO-embryonalen Mausfibroblasten (*mouse embryonic fibroblast*, MEF) gezeigt werden, dass ein Defekt im G1/S-Checkpoint zu einem verlängertem G2-Arrest führt (Foiyer et al. 2005). Weiterhin wurde in mehreren Veröffentlichungen beschrieben, dass nach Aufheben des G2/M-Checkpoints Zellen mit einem Defekt im G1/S-Checkpoint sensibler auf den zytotoxischen Effekt DNA-Schäden-induzierender Agenzien reagieren als Zellen mit intaktem G1/S-Checkpoint (Wang et al. 1996, Dixon and Norbury 2002). Auch diese Erkenntnis unterstützt die erhöhte Bedeutung des G2/M-Checkpoints in Abwesenheit von p53.

5.1.5. Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass p53 eine Rolle beim Aufheben des G2/M-Checkpoints nach Applikation einer Strahlendosis von 1 Gy besitzt. Die genaue Funktion von p53 konnte bisher jedoch nicht aufgeklärt werden. Ein möglicher Reparaturdefekt, der durch Verlust von p53 hervorgerufen wird, konnte jedoch ausgeschlossen werden. Zur Eingrenzung der möglichen Funktion von p53 beim Aufheben des G2/M-Checkpoints sollen in Zukunft weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Diese Arbeit lieferte erste Hinweise, dass p53 auf Ebene der Checkpointkinasen (Chk1/2) in den G2/M-Checkpoint eingreift. Bei der DNA-Schadensantwort scheint es einen zweistufigen Prozess zu geben. Bei der langsamen Antwort bindet p53 an das CDE/CHR-Element im Promotor verschiedener Gene. Es ist bekannt, dass p53

ebenso an den Chk1-Promotor bindet und es dadurch zur Repression des Chk1 kommt. Die Hypothese, dass eine p53-abhängige Repression von Chk1 zur Aufhebung des G2/M-Checkpoints führt, soll anhand von Untersuchungen mit Chk1-Plasmiden überprüft werden. Diese Plasmide tragen Mutationen im CDE/CHR-Element des Chk1-Promotors. Wenn eine Repression von Chk1 für den Wiedereintritt benötigt wird, sollten die mit Mutanten komplementierten p53-profizienten Zellen durch einen verlängerten G2-Arrest gekennzeichnet sein. Ebenfalls stellt die Überexpression von Chk1 eine Möglichkeit dar, die denkbare Repressionsfunktion von p53 außer Kraft zu setzen.

Ein weiterer Aspekt, der im Laufe der Untersuchungen auffiel, ist ein vorstellbarer strahleninduzierter Arrest in der Mitose in Abwesenheit von p53. Zum Beweis dieser Behauptung bietet sich die Beobachtung bestrahlter p53-defizienter Zellen im Live-cell-Mikroskop an. Diese Methode gestattet die Betrachtung von Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der Mitose befinden, und gibt Aufschluss über deren Reaktion. Kommt es aufgrund der Bestrahlung zur Initiation eines mitotischen Arrests, sollte keine Zellteilung beobachtet werden, da die Zelle in der Mitose verharret. Weiterhin ist beschrieben worden, dass die Plk1 eine inhibierende Wirkung auf das p73-Protein ausübt, dass für den Austritt aus der Mitose verantwortlich ist. Da in einem p53-defizienten Hintergrund eine erhöhte Proteinmenge der Plk1 verglichen mit p53wt Zellen vorkommt, soll außerdem überprüft werden, ob die Plk1 den Austritt aus der Mitose unterbindet. Dazu soll die Plk1 nach der Initiation des mitotischen Arrests mit spezifischen Inhibitoren gehemmt werden. Wenn die Plk1 den Arrest in der Mitose in p53-defizienten Zellen aufrechterhält, sollte die Inhibierung der Plk1 einen Wiedereintritt in den Zellzyklus zur Folge haben.

Die Untersuchungen der p53-defizienten Zellen lieferten neue Erkenntnisse über die Rolle von p53 am G2/M-Checkpoint. Es wird deutlich, dass in Abhängigkeit vom Ausmaß des induzierten Schadens dem p53-Protein eine andere Funktion zugeordnet werden kann. Die Aufklärung der exakten Funktion von p53 am G2/M-Übergang ist aus klinischer Sicht von großer Bedeutung. Das gezielte Eingreifen in den p53-Mechanismus könnte somit zur Bekämpfung vieler Krebsarten beitragen.

5.2. Rolle von ATM und Artemis bei der Reparatur von strahleninduzierten DNA-Schäden

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit den Proteinen Artemis und ATM und deren Beteiligung an der Reparatur strahleninduzierter DSBs. Bereits vor einigen Jahren konnte gezeigt werden, dass Artemis und ATM in der langsamen Reparatur der G1-Phase benötigt werden (Riballo et al. 2004). Bald darauf wurde auch eine Rolle von Artemis und ATM in der langsamen Reparatur in der G2-Phase postuliert (Deckbar et al. 2007). Interessanterweise zeigten jüngste Studien in primären Fibroblasten, dass der Artemis- und ATM-abhängige Reparaturdefekt in der G2-Phase mit dem von HR-defizienten Zellen vergleichbar ist, gemessen anhand von γ H2AX-Foci. Dieses Ergebnis war sehr überraschend, da HR-defiziente Zellen keinen Reparaturdefekt in der G1-Phase aufweisen, für Artemis und ATM aber auch in der G1-Phase eine Beteiligung bei der langsamen Reparatur beschrieben wurde (Beucher et al. 2009). Diese Erkenntnis lässt für das Artemis- und das ATM-Protein in der G2-Phase eine Funktion bei der HR vermuten, während sie in der G1-Phase an einem End-Joining-Weg beteiligt sind. Im Mittelpunkt der folgenden Untersuchungen steht daher der Nachweis der Beteiligung von Artemis und ATM bei der Reparatur über die HR in der G2-Phase. Durch die Etablierung spezifischer Methoden soll die mögliche Funktion von Artemis und ATM in der HR näher untersucht werden.

5.2.1. Spezifischer Nachweis der HR

Um eine mögliche Funktion von Artemis und ATM in der HR besser definieren zu können, wurden verschiedene Methoden angewandt. Die bereits unter 5.1.4.1. beschriebene Rad51-Foci-Analyse diente dabei dem Nachweis der Beladung der ssDNA. Im Gegensatz dazu ist mit der hier neu etablierten Methode, die auf der Markierung der DNA mit BrdU beruht, ein direkter Nachweis der durch Resektion entstandenen ssDNA möglich. Die Anwendung dieser beiden Methoden eröffnet eine bessere Zuordnung eines möglichen Defekts in der frühen HR auf die Resektion bzw. die Beladung der ssDNA mit Reparaturproteinen.

Die BrdU-Resektions-Foci können nur in der S und G2-Phase nachgewiesen werden und besitzen einen mit Rad51-Foci vergleichbaren kinetischen Verlauf (Abb. 4.14.). Dies war zu erwarten, da die Resektion der DSBs den initialen Schritt der HR darstellt und die HR auf die S- und G2-Phase beschränkt ist (Rothkamm et al. 2003, Thorslund and West 2007). In der vorliegenden Arbeit konnte weiterhin gezeigt wer-

den, dass der Verlust von Rad51 keinen Einfluss auf die Ausbildung der ssDNA hat, jedoch ist die Reparatur der resektierten DSBs unterbunden (Abb. 4.15. A). Diese Beobachtung deckt sich mit der Funktion von Rad51, die erst nach der Entstehung der ssDNA möglich ist, da Rad51 an die ssDNA bindet und die Stranginvasion erst möglich macht. Die BrdU-Resektions-Foci-Analyse eignet sich zum spezifischen Nachweis einzelsträngiger DNA, somit kann auch in Artemis- und ATM-depletierten Zellen diese Methode zur Untersuchung der Resektion der DSBs benutzt werden, während die Rad51-Foci-Analyse dazu genutzt wird, einen Defekt bei der Beladung der ssDNA zu untersuchen.

Die bisherigen Methoden beruhen auf der Untersuchung des initialen Schritts der HR, der DSB-Endresektion. Um eine Betrachtung der abgeschlossenen HR zu ermöglichen, wurde in dieser Arbeit eine weitere Methode nach Kao et al. (2001) etabliert. Diese basiert ebenfalls auf dem Einbau von BrdU anstelle des Thymidins in die DNA. In diesem Ansatz erfolgt der Einbau des BrdUs jedoch erst bei der Synthese der komplementären DNA-Stränge nach Ausbildung der doppelten Holliday-Junctions. In den HR-defizienten Zellen, wie die hier verwendeten Brca2- und Rad51-depletierten HeLa-S3-Zellen, konnte kein Einbau von BrdU beobachtet werden, während der Verlust von NHEJ-Faktoren (Ku80, Lig IV) keinen Einfluss auf den Einbau hat (Abb. 4.17. A). Diese Ergebnisse bestätigen die beschriebene Rolle von Brca2 und Rad51 bei der HR und verdeutlichen, dass in NHEJ-Mutanten HR erfolgen kann. Zudem kann anhand dieser Mutanten die Spezifität der neu etablierten Methode belegt werden.

5.2.2. Rolle von Artemis und ATM bei der DSB-Reparatur in der G1- und der G2-Phase

Bisher wurde in der Literatur für die Proteine Artemis und ATM eine Beteiligung in der langsamen Komponente der Reparatur strahleninduzierter DSBs in der G1- als auch in der G2-Phase von Fibroblasten beschrieben (Deckbar et al. 2007, Beucher et al. 2009). Da die langsame Reparatur in der G2-Phase die HR darstellt (Beucher et al. 2009), lässt sich vermuten, dass Artemis und ATM in der HR involviert sind. Hinweise für eine mögliche Funktion von ATM in der HR lieferten Studien von Beucher et al. (2009), in denen Epistasis-Analysen eine Rolle von ATM und Brca2 im selben Reparaturweg offenbaren. In den Studien von Takao et al. (1999) konnte gezeigt werden, dass ATM-defiziente DT40-Zellen ein erhöhtes Niveau chromosomaler

Aberrationen aufweisen. Da in DT40-Zellen bevorzugt HR abläuft (Takata et al. 1998, Sonoda et al. 2006), deutet das ebenfalls auf ein Involvieren von ATM in der HR hin. Im folgenden Abschnitt soll daher untersucht werden, ob Artemis und ATM in der HR von Bedeutung sind.

In der vorliegenden Arbeit konnte der bereits in Fibroblasten beschriebene Artemis- und ATM-abhängige Reparaturdefekt mit Hilfe der γ H2AX-Foci-Analyse auch in der HeLa-S3-Zelllinie, in der mittels siRNA-Technik Artemis und ATM herunterreguliert wurden, bestätigt werden. In der G1-Phase konnte ein Reparaturdefekt zu späteren Reparaturzeiten nachgewiesen werden, der 15-20 % der initialen DSBs betrifft (Abb. 4.13. B). In der G1-Phase ist die Artemis/ATM-abhängige Reparatur von der Funktion der DNA-PK abhängig (Riballo et al. 2004). Dies und die Tatsache, dass HR-Mutanten in G1 keine Beeinträchtigung der Reparatur zeigen, lässt darauf schließen, dass die langsame Komponente in G1 einen Unterweg des NHEJs darstellt (Riballo et al. 2004).

In der G2-Phase ist die Reparatur von 15-25 % der initialen DSBs von Artemis- und ATM abhängig (Abb. 4.13. C). Dieser Anteil ist mit dem von Brca2-depletierten HeLa-S3-Zellen vergleichbar (Abb. 4.13.). Da Brca2 für die HR notwendig ist, kann, wie bereits in früheren Studien beschrieben, eine wahrscheinliche Beteiligung von Artemis und ATM bei der HR vermutet werden.

Die Untersuchung der Resektion der strahleninduzierten DSBs in Artemis- bzw. ATM-depletierten Zellen lieferte erste Hinweise auf eine mögliche Funktion dieser Proteine beim initialen Schritt der HR. Zunächst konnte eine Einschränkung in der Ausbildung der Rad51-Foci beobachtet werden (Abb. 4.13. D). Dies ist konsistent mit der Veröffentlichung von Morrison et al. (2000), in der für ATM-defiziente Hühnerzellen (DT40) ebenfalls eine Störung in der Ausbildung der Rad51-Foci beobachtet werden konnte. Somit könnten die Proteine Artemis und ATM bei der Beladung der ssDNA mit Reparaturproteinen vonnöten sein. Da aber in der vorliegenden Arbeit ebenfalls eine verminderte Ausbildung der BrdU-Resektions-Foci nachgewiesen werden konnte, lässt sich vermuten, dass Artemis und ATM bereits bei der Resektion der DSBs involviert sind. Die Resektion der DSBs ist in Abwesenheit von Artemis und ATM zwar vermindert, jedoch kann kein vollständiges Unterbinden beobachtet werden. Daher kam die Frage auf, ob die resektierten DSBs trotzdem zum Abschluss der HR führen. Die Analyse der BrdU-Einbau-Foci widerlegt einen möglichen Abschluss der HR, denn sowohl in Artemis- als auch in ATM-depletierten Zellen kann ein kom-

pletter Defekt beim Einbau von BrdU nachgewiesen werden (Abb. 4.17. C). Artemis und ATM scheinen demnach auch für das vollständige Ablaufen der HR notwendig zu sein. Jüngste Studien in unserer Arbeitsgruppe konnten die Rolle von Artemis und ATM bei der HR bekräftigen. So zeigte sich, dass der Verlust von Artemis und ATM die Ausbildung von SCEs (*sister chromatid exchange*, Sisterchromatidaustausch), die während der HR entstehen, verhindert (Beucher et al. 2009).

5.3. Die Wahl des Reparaturweges in der G2-Phase

In der Literatur als auch in der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Reparatur von strahleninduzierten DSBs in einer G2-Zelle über zwei verschiedene Wege, das NHEJ und die HR, erfolgen kann. Es stellte sich nun die Frage, wann ein DSB über das NHEJ und wann über die HR repariert wird.

Eine mögliche Erklärung für die Entscheidung für den einen oder anderen Reparaturweg kann aus der Studie von Bennardo et al. (2008) gewonnen werden. In diesen Studien wurde die Resektion der DSBs unterbunden, in dem der für die Anresection der DSBs benötigte Faktor CtIP durch die Transfektion von siRNA ausgeschaltet wurde. Bei der Messung chromosomaler Aberrationen konnte festgestellt werden, dass nach Depletion von CtIP vermehrt Aberrationen entstanden, die für das NHEJ kennzeichnend sind, während die für die HR charakteristischen chromosomalen Änderungen seltener auftraten. Dies lässt darauf schließen, dass die Beeinflussung der Resektion der DSBs entscheidend für die Wahl des Reparaturweges sein kann.

Weitere Hinweise konnten von Goodarzi et al. (2008) in der G1-Phase postuliert werden. In diesen Studien konnte nachgewiesen werden, dass die ATM-abhängige Reparatur in der G1-Phase im Heterochromatin lokalisiert ist. Zudem konnte durch Öffnen des Heterochromatins die ATM-Abhängigkeit aufgehoben werden. Es ist somit vorstellbar, dass auch in der G2-Phase das Heterochromatin Einfluss auf die Wahl des Reparaturweges hat.

Im Mittelpunkt der nachfolgenden Abschnitte soll daher der Einfluss des Heterochromatins und der Resektion der DSBs auf die Wahl des Reparaturweges näher beleuchtet werden.

5.3.1. Einfluss der DSB-Endresektion auf die Wahl des Reparaturweges

In jüngster Zeit konnte gezeigt werden, dass der initiale Schritt der HR, die DSB-Endresektion, durch das Protein CtIP begünstigt wird (Satori et al. 2007, Huertas et

al. 2008). Deshalb wurde zur Untersuchung des Einflusses der DSB-Resektion auf die Wahl des Reparaturweges das CtIP depletiert.

In der vorliegenden Arbeit konnte in CtIP-depletierten Zellen zunächst ein Defekt in der Ausbildung der Rad51-Foci beobachtet werden (Abb. 4.21. B). Zusammen mit der Studie von You et al. (2009), die das Ausbleiben der RPA-Foci in CtIP-depletierten Zellen beschrieben, bestätigt der Defekt der Ausbildung der Rad51-Foci die beschriebene Rolle von CtIP bei der Resektion von DSBs. Die genaue Funktion von CtIP bei der DSB-Endresektion ist bisher noch unklar. So stellt sich die Frage, ob CtIP direkt für die Resektion verantwortlich ist oder indirekt durch Aktivierung eines weiteren Proteins resektierte DSBs entstehen. Mehrere Veröffentlichungen beschreiben eine Interaktion von CtIP mit dem MRN-Komplex (Mre11, Rad50 und Nbs1) (Sartori et al. 2007, Limbo et al. 2007, Yuan und Chen 2009). Die biochemische Basis dieser funktionalen Zusammenarbeit ist noch nicht geklärt. Für den MRN-Komplex konnte eine fördernde Rolle bei der Prozessierung der DSB-Enden beschrieben werden (Myers and Cortez 2006, Adams et al. 2006). Dabei konnte dem MRN-Komplex eine Nukleaseaktivität zugeordnet werden, die für die Reparatur der DSBs notwendig ist (Trujillo et al. 1998). Diese Nukleaseaktivität ist dem Mre11 zuzuschreiben (Furuse et al. 1998). In *in-vitro* Studien mit Hefeextrakten schneidet Mre11 in Kooperation mit Sae2 (CtIP-Homolog) Haarnadelstrukturen, die infolge einzelsträngiger DNA entstanden sind (Lengsfeld et al. 2007). In dieser Studie konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Sae2 selbst auch eine Endonukleaseaktivität besitzt. In humanen Zellen konnte zwar eine Interaktion von CtIP und dem MRN-Komplex beschrieben werden, jedoch scheint CtIP nur die Endonukleaseaktivität von Mre11 zu aktivieren. Eine eigene Nukleaseaktivität scheint CtIP nicht zu entwickeln (Sartori et al. 2007). Es ist daher möglich, dass CtIP in Säugerzellen nur eine aktivierende Funktion bei der Resektion ausübt.

Bei der Betrachtung der γ H2AX-Foci-Analyse fiel auf, dass die Depletion von CtIP in der G2-Phase zu einer schnelleren Reparatur der DSBs führt (Abb. 4.21. B). In Kapitel 5.1.4.1. konnte aufgezeigt werden, dass das NHEJ mit einer höheren Geschwindigkeit abläuft als die HR. Zusammen mit dem Ausbleiben der DSB-Endresektion deutet die schnelle Reparatur nach Depletion von CtIP somit auf einen Wechsel des Reparaturweges zugunsten des NHEJs hin. Bestätigend zu dieser Annahme zeigten Limbo et al. (2007) bereits anhand von Transformationsassays, dass das Ausschalten des CtIP-Analogons Ctp1 in der Spalthefe (*Schizosaccharomyces pombe*) zu

einem erhöhten Niveau an NHEJ im Vergleich zu Ctp1-profizienter Spalthefe führt. Neueste Untersuchungen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. P. Jeggo, die das Aufheben des HR-abhängigen Reparaturdefektes durch Depletion von CtIP aufzeigen, bekräftigen ebenfalls einen Wechsel zu Gunsten des NHEJs nach Unterbinden der Resektion (Prof. Dr. P. Jeggo, mündliche Mitteilung).

5.3.2. Einfluss des Heterochromatinstatus auf die Wahl des Reparaturweges

Goodarzi et al. (2008) konnten zeigen, dass die in Abwesenheit von ATM unrepariert verbleibenden DSBs in der G1-Phase am Heterochromatin assoziiert sind. Weiterhin wiesen sie nach, dass ATM für die Reparatur der DSBs innerhalb des Heterochromatins von Bedeutung ist, da die Depletion des Heterochromatin-bildenden Faktors Kap1 zur Aufhebung des ATM-abhängigen Reparaturdefekts führt. Es ist bekannt, dass ATM neben seiner Funktion im Checkpoint-Signalling auch für die Lockerung des Chromatins nach Ausbildung eines DSB verantwortlich ist (Verger und Crossley 2004, Ziv et al. 2006). Dabei phosphoryliert ATM Kap1 am Serin 824, was zu einer DSB-induzierten Auflockerung des Heterochromatins führt (Ziv et al. 2006). Anhand ihrer Ergebnisse und der beschriebenen Rolle von ATM bei der Lockerung des Heterochromatins schlossen Goodarzi et al. (2008) darauf, dass in der G1-Phase die Reparatur der DSBs im Heterochromatin mit der langsamen Kinetik erfolgt und ATM für die Änderung des Kap1-abhängigen Heterochromatinstatus benötigt wird. Da für ATM in der vorliegenden Arbeit eine Funktion in der langsamen Komponente in G2 beschrieben werden konnte, stellte sich die Frage, ob ATM auch in der G2-Phase eine Funktion bei der lokalen Öffnung des Heterochromatins zugeschrieben werden kann.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch in der G2-Phase der ATM-abhängige Reparaturdefekt durch Herunterregulation von Kap1 aufgehoben werden kann (Abb. 4. 18. B). Diese Beobachtung befürwortet zum einen die Rolle von ATM bei der Änderung des Kap1-abhängigen Heterochromatinstatus, indem es Kap1 phosphoryliert, zum anderen kann anhand der in dieser Arbeit identifizierten Funktion von ATM bei der HR vermutet werden, dass die DSBs in der G2-Phase, die im Heterochromatin lokalisiert sind, über die HR repariert werden. Bei der Charakterisierung des ablaufenden Reparaturweges nach Kap1/ATM-Depletion konnte gezeigt werden, dass der Einbau von BrdU stark vermindert ist (Abb. 4.18. D). Somit scheint die Reparatur der strahleninduzierten DSBs weniger über die HR zu erfolgen.

Weiterhin konnte eine reduzierte Ausbildung der Rad51-Foci in Kap1/ATM-depletierten Zellen beobachtet werden (Abb. 4.18. C). Eine Aussage darüber, ob ein Defekt in der Resektion der DSBs oder nur die Beladung der ssDNA mit Reparaturproteinen vorliegt, kann anhand der Rad51-Foci-Analyse nicht erfolgen. Zur Klärung dieser Frage müsste die Resektion direkt über die BrdU-Resektions-Foci gemessen werden. Da in dieser Arbeit jedoch für die ATM-depletierten Zellen eine Beeinträchtigung der DSB-End-Resektion beobachtet werden konnte (Abb. 4. 15. B), kann vermutet werden, dass auch in Kap1/ATM-depletierten Zellen die Resektion beeinflusst sein könnte. Nichts desto trotz ist die Resektion auch nach Änderung des Kap1-abhängigen Heterochromatinstatus in einem ATM-defizienten Hintergrund nicht komplett unterbunden, trotzdem scheint weniger HR anzulaufen.

Die Änderung des Heterochromatinstatus in einem ATM-defizienten Hintergrund lässt vermuten, dass der Status des Heterochromatins Einfluss auf die Wahl des Reparaturweges ausübt. Aus diesem Grund sollte überprüft werden, ob bereits die alleinige Depletion von Kap1 einen Wechsel des Reparaturweges hervorruft.

Doch zunächst schien die Änderung des Kap1-abhängigen Heterochromatinstatus die Reparatur strahleninduzierter DSBs in der G2-Phase nicht zu beeinflussen, denn in Kap1-depletierten Zellen ist eine mit Kontrollzellen vergleichbare Reparatur zu beobachten (Abb. 4.19. A, C). Jedoch konnte anhand des spezifischen Nachweises der HR durch Einbau von BrdU ein Einfluss des Heterochromatins auf die Reparatur bestätigt werden, da in Kap1-depletierten Zellen eine Verminderung der HR-Ereignisse beobachtet werden konnte (Abb. 4.20. C). So scheinen Heterochromatin-assoziierte DSBs, die bei einer Kap1-Provizienz über die HR repariert werden, nun über einen End-Joining-Weg beseitigt zu werden. Wie im Fall von CtIP (vergleiche Kapitel 5.3.1.) wäre bei einem Wechsel vom HR in einen NHEJ-Weg eine schnellere Reparatur, gemessenen anhand der γ H2AX-Foci-Analyse, zu erwarten gewesen. Diese Annahme konnte in Kap1-depletierten Zellen jedoch nicht bestätigt werden (Abb. 4.19. A, C). Ein bedeutender Unterschied zwischen CtIP- und Kap1-depletierten Zellen könnte die Resektion darstellen. Denn während die Depletion von CtIP ein Ausbleiben der Resektion zur Folge hat, treten in Kap1-depletierten Zellen weiterhin Rad51-Foci auf. Die Ausbildung der Rad51-Foci ist jedoch leicht eingeschränkt, was sowohl in HeLa-S3- als auch in 82-6hTert-Zellen beobachtet werden konnte (Abb. 4.20. A-B). Die Ausbildung der RPA-Foci ist durch Depletion von Kap1 nicht beeinträchtigt (Dr. V. Geuting, mündliche Mitteilung). Der Heterochromatinstatus hat demnach keinen Ein-

fluss auf die Resektion der DSBs. Die erfolgte Resektion könnte eine schnellere Reparatur verhindern, da zunächst die Prozessierung der resektierten DNA-Enden notwendig ist. Diese Ergebnisse sind sehr überraschend, da trotz resektierter DSB-Enden ein Wechsel hin zu einem NHEJ-Weg möglich zu sein scheint.

Wenn tatsächlich durch Änderung des Kap1-abhängigen Heterochromatinstatus ein Wechsel von der HR hin zum NHEJ stattfindet, sollte der Brca2- bzw. der Rad51-abhängige Reparaturdefekt ebenfalls durch Öffnen des Heterochromatins beseitigt werden können. In der Tat führte die Depletion von Kap1 zusammen mit Brca2 bzw. Rad51 in unterschiedlichen Zelllinien zum Verlust des HR-abhängigen Reparaturdefekts (Abb. 4.19. A, C). Entsprechend der Funktion von Brca2 bei der Beladung der ssDNA mit Rad51 konnten keine Rad51-Foci als indirekter Nachweis der Resektion beobachtet werden (Abb. 4.20. A, B). Neueste Daten unserer Arbeitsgruppe beweisen, dass weiterhin RPA-Foci ausgebildet werden (Dr. V. Geuting, mündliche Mitteilung), somit scheint nach wie vor die Resektion der DSBs ablaufen zu können. Trotz erfolgter Resektion und Aufheben des Brca2-abhängigen Reparaturdefekts konnte in Kap1/Brca2-depletierten Zellen kein Einbau von BrdU beobachtet werden (Abb. 4.20. C). Somit kann eine Brca2-unabhängige Reparatursynthese ausgeschlossen werden. Vielmehr unterstützen diese Ergebnisse die Hypothese des Wechsels des Reparaturweges nach Änderung des Kap1-abhängigen Heterochromatinstatus. Weiterhin bestätigen diese Ergebnisse, dass auch nach Resektion der DSBs ein NHEJ-Weg für die Reparatur gewählt werden kann. Die Untersuchungen in HR-defizienten Zellen besagen weiterhin, dass die DSBs, die in der G2-Phase über die HR repariert werden, im Heterochromatin lokalisiert sind.

5.3.3. Überlegungen zur Wahl des Reparaturweges in Abhängigkeit vom Heterochromatin

Zusammenfassend liefern diese Ergebnisse erstaunliche Hinweise darauf, dass strahleninduzierte DSBs, die sich in den heterochromatischen Bereichen befinden, resektiert und anschließend über die HR repariert werden. Die Änderung des Kap1-abhängigen Heterochromatinstatus bewirkt einen Wechsel des Reparaturweges, der unabhängig von ATM, Brca2 und Rad51 ist. Dies spricht dafür, dass die Reparatur der DSBs über einen alternativen NHEJ-Weg abläuft. Diese gewonnenen Erkenntnisse lieferten Ansatzpunkte für neue Projekte in unserer Arbeitsgruppe.

Die Theorie eines möglichen Wechsels des Reparaturweges in Abhängigkeit des Chromatinstatus wurde auf Ebene der SCE-Analysen, die zur Messung von HR-Ereignissen geeignet sind, weiter verfolgt. Erste Ergebnisse von Kap1/Brca2-depletierten Zellen scheinen den Wechsel weg von der HR zu bestätigen. So können im Vergleich zu Kontrollzellen keine strahleninduzierten SCEs gemessen werden (J. Künzel, mündliche Mitteilung).

Die Hypothese des Wechsels von der HR hin zum NHEJ wurde ebenfalls in unserer Arbeitsgruppe in Kap1-depletierten Zellen, die mit einem Inhibitor gegen DNA-PK behandelt wurden, weiter untersucht. Die DNA-PK ist ein beim NHEJ unersetzbarer Faktor. Die Inhibition der DNA-PK führt in Wildtypzellen zu einem deutlichen Reparaturdefekt, da kein NHEJ stattfinden kann. Darüber hinaus zeigt sich in Kap1-depletierten Zellen nach Inhibition der DNA-PK ein zusätzliches Ausmaß unreparierter DSBs (Dr. V. Geuting, mündliche Mitteilung). Dies sind erste Bestätigungen dafür, dass nach Öffnen des Heterochromatins nahezu alle DSBs über das NHEJ repariert werden.

Eine mögliche Erklärung für eine Entscheidung zugunsten des NHEJ nach erfolgreicher Öffnung des Heterochromatins könnte die Resektion der DSBs liefern. Bisher wurde angenommen, dass die Entscheidung über die Wahl des Reparaturweges aufgrund der DSB-Endresektion erfolgt d.h. sowie ein DSB resektiert wird, wählt die Zelle die HR zur Reparatur (Ira et al. 2004, Huertas 2010). In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass die Änderung des Kap1-abhängigen Heterochromatinstatus keinen Einfluss auf die Resektion der strahleninduzierten DSBs ausübt. Somit kann nicht das Ausbleiben der Resektion nach Änderung des Heterochromatinstatus für die Entscheidung eines Wechsels des Reparaturweges verantwortlich gemacht werden.

Vorstellbar ist vielmehr, dass eine entscheidende Rolle für einen möglichen Wechsel zwischen den Reparaturwegen dem ATM zugeordnet werden kann. Möglicherweise bleibt ATM solange am DSB gebunden bis dieser vollständig resektiert wurde. Nach der kompletten Resektion verliert das ATM seine Affinität und fällt vom DSB ab. ATM ist nun nicht mehr in der Lage Kap1 am Serin 824 zu phosphorylieren. Dadurch könnte ein weiteres Öffnen des Heterochromatins in der Nähe des DSB ausbleiben. Es kann nun spekuliert werden, dass nach Beendigung der Resektion und der damit verbundenen Wiederherstellung des geschlossenen Heterochromatinstatus die Reparatur des DSB über die HR vorbestimmt ist. Wird nun die Notwendigkeit von ATM

durch die Depletion von Kap1 aufgehoben, wäre es denkbar, dass die Reparatur trotz Resektion über das NHEJ erfolgen kann. Zur Überprüfung dieses Erklärungsansatzes sollen in Zukunft Versuche mit Kap1-Derivaten, die am Serin 824 mutiert sind, durchgeführt werden. Sollte die Phosphorylierung am Serin 824 für den Wechsel des Reparaturweges mit verantwortlich sein, müsste die Komplementation mit einer Phosphomimikmutante (S824E) den ATM-, Brca2- und Rad51-abhängigen Reparaturdefekt aufheben können.

Ein weiteres denkbare Argument für die Wahl des NHEJ nach Depletion von Kap1 könnte die räumliche Entfernung von Schwesterchromatiden darstellen. Für die HR ist es wichtig, dass sich die Schwesterchromatide in räumlicher Nähe befinden um eine Stranginvasion zu gewährleisten. Daher ist es möglich, dass das Heterochromatin bei einem strahleninduzierten DSB nur lokal aufgelöst werden muss, damit die Reparaturproteine an den DSB binden können und die Schwesterchromatide weiterhin in räumlicher Nähe bleiben. Die Depletion von Kap1 könnte eine viel größere Auflockerung des Heterochromatins zur Folge haben, was die Schwesterchromatide in eine zu große Entfernung bringt und somit zum Verlust des für die HR benötigten komplementären DNA-Strangs führt. Die Reparatur des strahleninduzierten DSBs muss daher über das NHEJ erfolgen.

5.3.4. Modell zur Wahl des Reparaturweges in G2

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ermöglichten die Aufstellung eines Modells zur Wahl des Reparaturweges in der G2-Phase. Die Reparatur der strahleninduzierten DSBs erfolgt zum Großteil mit einer schnellen Kinetik, nur 15-20% strahleninduzierten DSBs werden mit einer langsamen Kinetik beseitigt werden. In der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die DSBs, die mit der langsamen Kinetik repariert werden, im Heterochromatin lokalisiert sind und über die HR beseitigt werden. Den initialen Schritt der HR bildet dabei die DSB-Endresektion, die von CtIP vermittelt wird. Die Depletion von CtIP und die damit verbundene Inhibierung der DSB-Endresektion führen dazu, dass die Zelle all ihre DSBs über einen im Vergleich zur HR schnelleren NHEJ-Weg repariert. Jedoch scheint die Resektion der DSBs nicht den letztmöglichen Wendepunkt bei der Wahl des Reparaturweges darzustellen. So konnte in Zellen, in denen weiterhin eine CtIP-vermittelte Resektion der DSBs erfolgen kann, durch Depletion von Kap1 ebenfalls ein Wechsel hin zum NHEJ beobach-

tet werden. In diesem Fall kommt es jedoch nicht zur Erhöhung der Geschwindigkeit der Reparatur. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die resektierten DNA-Enden vor der Reparatur über einen NHEJ-Weg noch einer Prozessierung bedürfen. Somit ist auch der Kap1-abhängige Heterochromatinstatus bei der Wahl des Reparaturweges entscheidend.

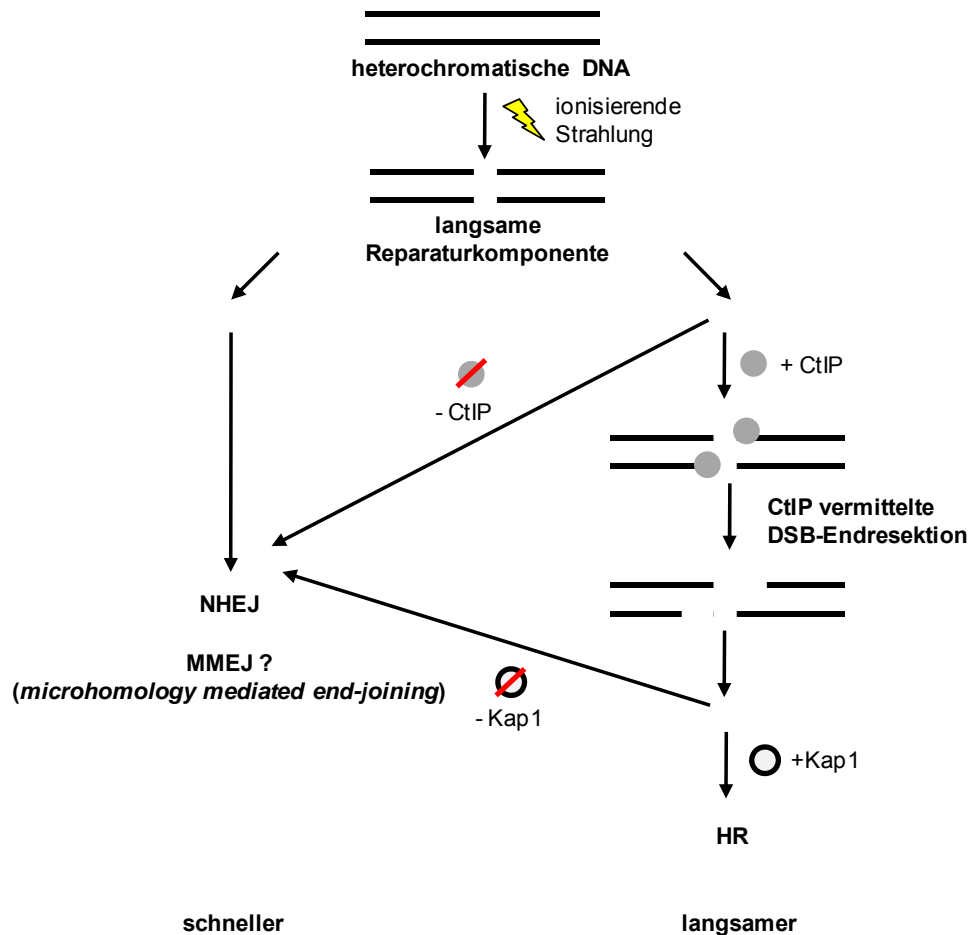


Abb. 5.1. Modell zum Einfluss von CtIP und Kap1 auf die Wahl des Reparaturweges

5.4. Einfluss der DSB-Endresektion auf die Reparatur strahleninduzierter DSBs

5.4.1. Einfluss der DSB-Endresektion auf die Artemis- und ATM-abhängige Reparatur

In dieser Arbeit konnte für Artemis und ATM eine Funktion bei der langsamen Reparatur strahleninduzierter DSBs im End-Joining-Weg in der G1-Phase und in der HR in der G2-Phase beschrieben werden. Da für die HR die Resektion der DSBs notwendig ist, Artemis und ATM aber sowohl im NHEJ als auch in der HR benötigt werden, wurde vorausgesetzt, dass die Artemis- und ATM-Abhängigkeit in der G2-Phase nicht aufgrund der DSB-Endresektion herbeigeführt werden. Zu unserer Überras-

schung führte die Depletion von CtIP zur Aufhebung des Artemis- und ATM-abhängigen Reparaturdefekts in der G2-Phase (Abb. 4.22.). Die Artemis- und ATM-Abhängigkeit in der G2-Phase könnte somit eine Folge der Resektion der DSBs sein, obwohl diese Proteine ebenfalls eine Funktion in der G1-Phase im End-Joining -Weg besitzen.

Bisher war ein Nachweis der Resektion von DSBs in der G1-Phase nicht möglich, daher ging man davon aus, dass hier auch keine Resektion der DSBs erfolgt. Überraschenderweise konnte in jüngster Zeit in der G1-Phase von Hühnerzellen ein Einfluss von CtIP nachgewiesen werden (Yun und Hiom 2009). Dies war sehr erstaunlich, da für CtIP bisher eine Zellzyklusphasen-spezifische Regulation beschrieben wurde, wobei CtIP im hohen Maß in der S- und G2-Phase vorkommt, während es in der G1-Phase kaum vorhanden ist (Yu und Baer 2000). CtIP wird erst in der späten G1-Phase hochreguliert, da es für den Übertritt in die S-Phase vonnöten ist (Liu und Lee 2006, Wu und Lee 2006). Die Ergebnisse von Yun und Hiom (2009) eröffneten den Gedanken, dass eventuell auch in der G1-Phase CtIP eine Resektion vermittelt. In der vorliegenden Arbeit sollte daher auch der mögliche Einfluss von CtIP auf die langsame Reparatur in der G1-Phase untersucht werden. Auf den ersten Blick hat der Verlust von CtIP keinen Einfluss auf die Reparatur in der G1-Phase, denn nach Depletion von CtIP konnte anhand der γ H2AX-Foci-Analyse keine Änderung der Reparaturgeschwindigkeit wie in G2 beobachtet werden (vergleiche Kapitel 5.3.1.). Dies war nicht weiter erstaunlich, da die langsame Reparatur in G1 einen alternativen NHEJ-Weg darstellt, der dennoch mit einer höheren Geschwindigkeit abläuft als die langsame Komponente in G2. Bemerkenswerterweise führte die Depletion von CtIP in einem Artemis- bzw. ATM- defizienten Hintergrund in der G1-Phase zum Aufheben des Reparaturdefekts (Abb. 4.23.). Da CtIP in der G2-Phase die Resektion der DSBs fördert, könnte auch eine DSB-Endresektion bei der langsamen Reparatur in der G1-Phase denkbar sein, die zur Ausbildung der Artemis- und ATM-Abhängigkeit führt. Eine mögliche Resektion der DSBs in der G1-Phase ist in der Literatur noch sehr kontrovers diskutiert. So zeigen Untersuchungen in der Hefe, dass in der G1-Phase die NHEJ-Faktoren Ku70/80, Dnl4 (DNA-Ligase1) und Lif1 (Xrcc5) die Resektion in der G1-Phase unterdrücken. Nur in Abwesenheit dieser Faktoren kann in der G1-Phase Resektion stattfinden, die durch eine erhöhte Rekrutierung des MRX-Komplexes ermöglicht wird (Zhang et al. 2007, Clerici et al. 2008). Weiterhin spricht die Abhängigkeit der Resektion von den CDKs, die CtIP phosphorylieren, gegen eine

Resektion in G1. Für CDKs konnte in mehreren Arbeiten eine Rolle bei der Resektion beschrieben werden. Die CDKs weisen dabei eine hohe Aktivität in S und G2 auf (Ira et al. 2004, Aylon et al. 2004, Jazayeri et al. 2006). Aber es existieren auch Studien in Hefen, die die Annahme von Resektion in der G1-Phase unterstützen. So wies Barlow et al. (2008) in Hefezellen die Rekrutierung von Rfa1 (RPA) an die strahlen-induzierten DSBs in der G1-Phase nach. Die Resektion in G1 scheint allerdings mit einem etwas anderen Mechanismus als in G2 abzulaufen, wo die Prozessierung durch Zusammenarbeit von CtIP und MRN initiiert wird (Sartori et al. 2007). Barlow et al. (2008) zeigten in Hefezellen, dass die Depletion von Sae2 eine Verzögerung der Resektion in G1 zur Folge hat. Sae2 scheint somit einen Einfluss auf die Resektion zu nehmen. Eine Beeinträchtigung der Resektion in der G1-Phase blieb dagegen in einer Mre11-Nukleasemutanten aus (Barlow et al. 2008). Somit scheint die Resektion in G1 nicht von der Nukleaseaktivität des MRN-Komplexes abhängig zu sein.

Obwohl anhand der Ergebnisse der Depletion von CtIP in einem Artemis- bzw. ATM-defizienten Hintergrund eine Resektion der DSBs in der G1-Phase postuliert werden kann, konnten in der vorliegenden Arbeit keine Rad51-Foci in der G1-Phase nachgewiesen werden. Es ist bekannt, dass sich in der G2-Phase an die CtIP-vermittelte Anresection der DSBs ein weiterer Resektionsschritt anschließt. In diesem Schritt kann die Ausbildung ausgedehnter einzelsträngiger 3'-Überhänge zum einen über die 5'-3'-Exonuklease 1 (EXO1) und zum anderen unter Beteiligung der Helikase BLM erfolgen (Mimitou et al. 2008, Gravel et al. 2008, Nimonkar et al. 2008). Die Expression der Helikase BLM wird während des Zellzyklus reguliert und erreicht das höchste Niveau in der S- und der G2-Phase, während es in der G1-Phase wieder abnimmt (Ababou et al. 2000, Bischof et al. 2001). Eine derartige Zellzyklus-abhängige Regulation ist für EXO1 bisher nicht bekannt. Ein denkbares Fehlen von BLM und EXO1 in der G1-Phase könnte somit nur eine Anresection der DSBs zur Folge haben, die für die Ausbildung von Rad51- und RPA-Foci nicht ausreichend sein könnte.

5.4.3. Regulation von CtIP in der G1- und G2-Phase

Die Regulation des CtIPs erfolgt durch Phosphorylierungsprozesse. Dabei wurde das Threonin 847 im C-Terminus des CtIPs als notwendige Phosphorylierungsstelle für die Förderung der DSB-Endresection identifiziert (Huertas et al. 2008, Huertas und Jackson 2009). Für diese Phosphorylierung ist die CDK1 verantwortlich, die nur in

der S- und G2-Phase aktiviert vorliegt (Huertas et al. 2008). Somit könnte angenommen werden, dass CtIP in der G1-Phase eine andere Funktion ausübt als in der G2-Phase. In der vorliegenden Arbeit wurden daher Komplementation mit einer Phosphomutante, in der das Threonin 847 durch ein Alanin ausgetauscht wurde, in einem Artemis- und ATM-defizienten Hintergrund durchgeführt. In der G2-Phase führte die Komplementation zum Aufheben des Artemis- bzw. ATM-abhängigen Reparaturdefekts (Abb. 4.25.). Dies bestätigt noch einmal, dass die Resektion der DSBs die Artemis- und ATM-Abhängigkeit herbeiführt, da die Phosphorylierung des CtIPs am Threonin 847 für die resektionsvermittelte Funktion in der G2-Phase benötigt wird. Erstaunlicherweise konnte auch in der G1-Phase ein Aufheben des Artemis- bzw. ATM-abhängigen Reparaturdefekts durch Komplementation mit einer CtIP-Phosphomutante beobachtet werden (Abb. 4.26.). Somit scheint auch in der G1-Phase die Phosphorylierung des Threonins 847 und die damit verbundene Resektionsfunktion von CtIP für die Artemis- bzw. ATM-Abhängigkeit verantwortlich zu sein. Bei der langsamen Reparatur in der G1- als auch in der G2-Phase wird demnach CtIP durch Phosphorylierung des Threonins 847 aktiviert. Dies widerspricht jedoch der Studie von Yun und Hiom (2009), die eine Notwendigkeit der Phosphorylierung am Threonin 847 für die HR postulieren nicht aber für das MMEJ. Das MMEJ (*microhomology-mediated end joining*) ist ein weniger charakterisierter Reparaturweg, der auf der Nutzung von Mikrohomologien beruht und immer zu Deletionen führt (McVey und Lee 2008). Das MMEJ könnte einen möglichen Kandidaten der langsamen Reparaturkomponente in der G1-Phase darstellen.

Da die Phosphorylierung des CtIPs am Threonin 847 von CDK1 abhängig ist und diese nur in der S- und G2-Phase aktiviert vorliegt (Sartori et al. 2007, Huertas et al. 2008), stellte sich die Frage, ob in der G1-Phase die CDK4 und CDK6 für diese Phosphorylierung von Bedeutung sind. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit die CDKs durch Behandlung mit Roscovitin inhibiert. Roscovitin hemmt selektiv die CDKs, während andere Kinasen nicht beeinträchtigt werden (de Azevedo et al. 1997, Bach et al. 2005). Wie zu erwarten war, führte in der G2-Phase die Behandlung mit Roscovitin zur Abnahme der Rad51-Foci-Ausbildung. Weiterhin konnte der Artemis-abhängige Reparaturdefekt in der G2-Phase aufgehoben werden (Abb. 4.27.). Dies bestätigt, dass die Resektion in G2 von CDKs abhängig ist, was bereits in mehreren Veröffentlichungen beschrieben wurde (Ira et al. 2004, Jazayeri et al. 2006). Im Gegensatz zur G2-Phase hat die Inhibition der CDKs in der G1-Phase keinen Effekt auf

die Reparatur strahleninduzierter DSBs in Artemis-defizienten Zellen. Dies lässt vermuten, dass in der G1-Phase die Resektion der DSBs unabhängig von CDKs erfolgen könnte. Allerneueste Studien in der Hefe geben erste Hinweise auf eine Phosphorylierung durch eine andere Kinase. Es konnte gezeigt werden, dass Sae2 am Serin 267 (analog zum Threonin 847 im CtIP) durch Cdc5 reguliert werden kann (Donnianni et al. 2010). Cdc5 gehört den Polo-like-Kinasen (Plk) an. In der Hefe wird nur das Cdc5 exprimiert, während in Säugern 4 Polo-like-Kinasen vorkommen (van de Weerdts und Medema 2006). Einige dieser Polo-like-Kinasen werden auch in der G1-Phase aktiviert. So wird z.B. die Plk3 als Antwort auf einen DNA-Schaden abhängig von ATM in der G1-Phase phosphoryliert (Bahassi et al. 2002). Es ist somit denkbar, dass in der G1-Phase eine Plk die Phosphorylierung am Threonin 847 übernehmen könnte.

5.4.4. Der funktionelle Beitrag von Artemis bei der Reparatur resektierter strahleninduzierter DNA-Doppelstrangbrüche

Artemis konnte in dieser Arbeit eine Rolle in der HR zugeschrieben werden. Die genaue Funktion von Artemis bei der HR ist dabei noch nicht geklärt. Auffällig ist, dass in Abwesenheit von Artemis die Resektion beeinflusst wird, was anhand einer verminderten Ausbildung von Rad51-Foci und der Detektion von ssDNA zu beobachten ist (Abb. 4.13. E und Abb. 4.15. B). Bestätigend dazu konnte in unserer Arbeitsgruppe eine verringerte Phosphorylierung von RPA in Artemis-defizienten Zellen im Western Blot beobachtet werden (Dr. S. Naumann, mündliche Mitteilung). Artemis scheint somit bei einem frühen Schritt der HR von Nutzen zu sein. Dieses Erkenntnis war deshalb überraschend, da Artemis im Gegensatz zu Brca2 sowohl in der HR als auch beim NHEJ benötigt wird.

In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass die Artemis-Abhängigkeit in der langsamen Reparatur sowohl in der G1-Phase als auch in der G2-Phase durch Depletion von CtIP aufgehoben werden kann. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die Notwendigkeit von Artemis bei der Reparatur in der G1- und G2-Phase aufgrund der Resektion der DSBs entsteht. Nähere Untersuchungen weisen daraufhin, dass die Resektion der DSBs in beiden Phasen über die Phosphorylierung des CtIPs am Threonin 847 reguliert wird.

Die genaue Funktion von Artemis bei der langsamen Komponente der Reparatur bleibt unklar. Es ist bereits bekannt, dass die Endonuklease Artemis in der V(D)J-

Rekombination für die Prozessierung verschiedener Strukturen wie Haarnadelstrukturen, 5'-3'-Überhänge, Schleifenstrukturen und einzelsträngiger Lücken notwendig ist (Ma et al. 2005a, van der Burg et al. 2007). Diese Substratvielfalt könnte auf eine Beteiligung von Artemis bei der Entfernung von strahleninduzierten DNA-Schäden bzw. sekundären Strukturen hindeuten, die infolge der Resektion der DSBs entstehen.

Im Kapitel 5.3.2. konnte gezeigt werden, dass die DSBs, die mit einer langsamen Kinetik repariert werden, in den Bereichen des Heterochromatins auftreten. Das Heterochromatin besteht zu großen Teilen aus hochrepetitiven Sequenzen (Henikoff 2000, Grewal und Moazed 2003), was das Auftreten von palindromischen Sequenzen erhöht. Nach der Resektion der DSBs kommt es zur Ausbildung von 3'-Überhängen. Beim Auftreten von palindromischen Sequenzen in diesem Bereich könnte es nun zur Ausbildung von sogenannten *fold back loops* kommen. Diese verhindern eventuell auch den Nachweis der ssDNA, so dass eine scheinbar verminderte Resektion der DSBs beobachtet wird. Die Prozessierung dieser entstandenen Strukturen in der G1- und der G2-Phase könnte ähnlich wie bei der V(D)J-Rekombination durch die Endonukleaseaktivität von Artemis erfolgen.

Die Endonukleaseaktivität von Artemis muss zunächst aktiviert werden. Anfänglich wurde vermutet, dass die Aktivierung von Artemis durch Phosphorylierung an spezifischen S/T-Q Motiven durch DNA-PK hervorgerufen wird (Ma et al. 2002, Ma et al. 2005b). In der Proteinsequenz von Artemis wurden 11 potentielle Phosphorylierungsstellen identifiziert. Mutationen dieser 11 Motive konnten jedoch keine Einschränkung der Endonukleaseaktivität von Artemis in der G1- oder in der G2-Phase auslösen (Goodarzi et al. 2006, Beucher et al. 2009). Inzwischen konnte gezeigt werden, dass durch Autophosphorylierung von DNA-PKcs die DNA-Orientierung modelliert wird, die somit die Zugänglichkeit von Artemis an die Sekundärstrukturen ermöglicht (Goodarzi et al. 2006, Gu et al. 2010).

5.4.5. Die Rolle von ATM bei der Reparatur resektierter strahleninduzierter DNA-Doppelstrangbrüche

Für ATM kann eine frühe Beteiligung bei der HR angenommen werden. So konnte in der vorliegenden Arbeit als auch in den Arbeiten von Chen et al. (1999) und Yuan et al. (2003) eine verminderte Resektion der DSBs in Abwesenheit von ATM beschrieben werden. In der Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass der ATM-abhängige

Defekt in der G1- und der G2-Phase durch Herunterregulation von CtIP aufgehoben werden kann (Abb. 4.22., Abb. 4.23.). Diese Beobachtung ließ vermuten, dass erst durch Resektion ATM-abhängige DSBs entstehen. Weiterhin lässt sich die ATM-Abhängigkeit in der G1- und der G2-Phase auf die durch Phosphorylierung des Threonin 847 aktivierte Resektionsfunktion von CtIP eingrenzen. Die genaue Rolle von ATM bei der Beteiligung an der Resektion ist jedoch noch unklar.

Der Proteinkinase ATM wird eine Beteiligung bei der Phosphorylierung vieler Substrate zugeordnet. Daher ist es nicht weiter abwegig anzunehmen, dass ATM auch bei der Resektion der strahleninduzierten DSBs durch die Kinasefunktion auf Proteine Einfluss ausübt, die an der Resektion beteiligt sind. Es ist bekannt, dass die Proteinkinase ATM nach strahleninduzierten DNA-Schäden aktiviert wird und eine Phosphorylierungskaskade in Gang setzt. Durch ATM werden die Checkpointkinasen Chk1/Chk2 phosphoryliert, die anschließend je nach Zellzyklus die Phosphatasen Cdc25A bzw. Cdc25C inaktivieren. Diese Phosphatasen können nun nicht mehr die CDKs durch Dephosphorylierung aktivieren (Costanzo et al. 2000, Reinhardt und Yaffe 2009). In der G2-Phase ist die Aktivierung der DSB-Endresektion von CDKs abhängig, wohingegen in der G1-Phase eine andere Kinase die Resektion der DSBs initiiert. Wie unter 5.4.3. postuliert, könnte eine Polo-like-Kinase für die Aktivierung des CtIPs in der G1-Phase verantwortlich sein. Für die Plk3 konnte bereits nachgewiesen werden, dass als Antwort auf einen DNA-Schaden die Phosphorylierung der Plk3 durch ATM erfolgt (Bahassi et al. 2002). Somit könnte in einem ATM-defizienten Hintergrund die Aktivierung der Plk3 unterbunden sein und die Resektion nicht erfolgen.

Neben der indirekten Aktivierung von CtIP ist ein direkter Einfluss von ATM wahrscheinlicher. In der Aminosäuresequenz von CtIP wurden 2 potentielle ATM Phosphorylierungsstellen, das Serin 664 und 745, identifiziert (Li et al. 2000, Wu und Lee 2006). Es ist vorstellbar, dass die vollständige Aktivierung von CtIP durch einen mehrstufigen Phosphorylierungsmechanismus erfolgt. Zunächst wird CtIP am Threonin 847 phosphoryliert und erst danach können weitere Phosphorylierungen stattfinden u.a. am Serin 664 und 745. In Abwesenheit von ATM könnte so nur eine teilweise Aktivierung des CtIPs erfolgen, was zur Einschränkung der Resektion der DSBs in ATM-defizienten Zellen führen könnte.

Eine weitere Möglichkeit der Rolle von ATM bei einem frühen Schritt der HR bzw. des MMEJs könnte die Rekrutierung von CtIP zu den DSBs darstellen. You et al.

(2009) postulieren für die Rekrutierung von CtIP zu den DSBs ein spezifisches Motiv in dessen Aminosäuresequenz (AS 509-557). Interessanterweise sind für die Rekrutierung an den DNA-Schaden zwei Lysinreste in diesem Motiv erforderlich (K513 und K515). Weiterhin schlussfolgerten You et al., dass eine Demaskierung des Motivs nach Induktion von DNA-Schäden erforderlich ist. Für diese Demaskierung scheint ATM bzw. ein Substrat von ATM von Bedeutung zu sein. Eine vollständige Resektion der DSB-Enden erfolgt erst nach Bindung von CtIP an die geschädigte DNA. In Abwesenheit von ATM wäre somit ein Binden von CtIP an den DSB nicht möglich und könnte so eine eingeschränkte Resektion zur Folge haben.

Ausgehend von der Beobachtung, dass die DSBs im heterochromatischen Bereich sowohl in der G1- als auch in der G2-Phase resektiert werden, könnte die unter 5.3.2. beschriebene Funktion von ATM bei der Umstrukturierung des Heterochromatins bei der Resektion eine entscheidende Rolle spielen. Erst nach Änderung des Kap1-abhängigen Heterochromatinstatus wäre somit eine vollständige Resektion der DSBs möglich.

5.4.6. Ausblick

Die Schlussfolgerung von stattfindender Resektion in der G1-Phase basiert vor allem auf der indirekten Analyse der Funktion von CtIP. Der direkte Nachweis von resektierten DSBs in der G1-Phase ist von großer Bedeutung. Zur zweifelsfreien Bestätigung müssen daher weitere Verfahren zum Nachweis resektierter DSBs etabliert werden. Ein erfolgsversprechender Ansatz könnte der Nachweis von resektierten DSBs anhand der Analyse des hSSB1, einem Faktor des SOSS-Komplexes, darstellen. Der SOSS-Komplex ist heterotrimerisch und setzt sich aus den Faktoren hSSB1/2, INTS3 und C9orf80 zusammen. Während der DNA-Reparatur erkennt der SOSS-Komplex einzelsträngige DNA-Bereiche und bindet an diese. Ein Vorteil gegenüber anderen ssDNA-Markern ist, dass die während der Replikation entstehenden einzelsträngigen DNA-Bereiche nicht erkannt werden. Somit ist es ein geeigneter Marker für induzierte DNA-Schäden, die resektiert wurden (Richard et al. 2008, Huang et al. 2009). Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass 30 min nach Bestrahlung bereits 95 % der Zellen hSSB1-Foci enthalten. Es kann also davon ausgegangen werden, dass auch in der G1-Phase auftretende ssDNA erkannt werden.

Ein Nachweis der resektierten DSBs in der G1-Phase anhand der Analyse von Rad51- und RPA-Foci war in der vorliegenden Arbeit nicht möglich. Dies könnte für

eine ineffektivere Resektion der DSBs in der G1-Phase im Gegensatz zur Resektion in der G2-Phase sprechen. In der G2-Phase ist für die Resektion ein zweistufiger Prozess beschrieben. Die Anresection der DSBs wird durch CtIP vermittelt. Im anschließenden 2. Schritt kann die Resektion entweder durch die Exonuclease 1 oder durch einen Blm-vermittelten Schritt fortgesetzt werden (Mimitou et al. 2008, Gravel et al. 2008, Nimonkar et al. 2008). In zukünftigen Projekten soll daher überprüft werden, ob auch in der G1-Phase ein Einfluss von Exo1 und Blm besteht oder ob nur ein einstufiger Resektionsprozess, der auf CtIP beruht, ablaufen kann. Dazu sollte die Artemis- bzw. ATM-Abhängigkeit in einem Blm- bzw. Exo1-defekten Hintergrund genauer untersucht werden.

Ein weiterer wichtiger Gesichtspunkt, der in der vorliegenden Arbeit Fragen aufwirft, ist die Aktivierung von CtIP in der G1-Phase. Die Aktivierung des CtIPs in der G2-Phase wird durch CDKs vermittelt. Für die G1-Phase konnte in dieser Arbeit keine Abhängigkeit von CDKs festgestellt werden. Daher soll in einem zukünftigen Projekt die Kinase identifiziert werden, die in der G1-Phase in der Lage ist CtIP am Threonin 847 zu phosphorylieren. Erste Hinweise auf einen möglichen Erklärungsansatz liefern Untersuchungen in Hefezellen. Hier wurde eine Aktivierung des CtIP-Analogons Sae2 durch die Polo-like-Kinase cdc5 postuliert (Donnianni et al. 2010). Da Plks auch in der G1-Phase aktiv sein können (Bahassi et al. 2002), sollte in Zukunft überprüft werden, ob die Plks in der G1-Phase an der Aktivierung von CtIP beteiligt sind. Ein möglicher Versuchsansatz stellt die Inhibition der Plks dar. Sollten die Plks für die Aktivierung von CtIP in der G1-Phase verantwortlich sein, hätte die Inhibition der Plks ab dem Zeitpunkt der Bestrahlung den Verlust des Reparaturdefekts in Artemis-defizienten Zellen zur Folge. Geeignete Inhibitoren sind BI2536 (Lenart et al. 2007) und eine von Emmitte et al. (2009) beschriebene Chemikalie.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen in der G2-Phase auf eine Wahl des Reparaturweges in Abhängigkeit der Prozessierung der DSBs schließen. Da für die Prozessierung der DSBs ein zweistufiger Prozess vonnöten ist, soll in weiteren Projekten untersucht werden, ob bereits die limitierte Resektion, vermittelt durch CtIP, bestimmend für die Wahl des Reparaturweges ist oder ob erst nach Ablauf der vollständigen Resektion des DSBs ein Wechsel zwischen den beiden Reparaturwegen verhindert werden kann. In zukünftigen Projekten soll daher untersucht werden, ob auch die Herunterregulation der möglicherweise am zweiten Resektionsschritt beteiligten Proteine, Exo1 und Blm, in einem HR-defekten Hintergrund den Weg ins NHEJ er-

möglichst. Dieser Ansatz hilft bei dem Verständnis, ab wann der Weg in die HR unwiderruflich festgelegt wird.

In dieser Arbeit wurde nur auf die Regulation des CtIPs durch die Phosphorylierung am Threonin 847 näher eingegangen. In der Aminosäuresequenz des CtIPs wurden jedoch weitere Phosphorylierungsstellen identifiziert. So wird in der Studie von Yun und Hiom (2009) eine weitere für die Resektion notwendige Phosphorylierungsstelle im CtIP am Serin 327 beschrieben. Es stellt sich nun die Frage, ob die Resektion der DSBs in der G1- und der G2-Phase bereits durch eine einzelne Phosphorylierung oder erst durch einen mehrstufigen Phosphorylierungsprozess ermöglicht wird. Dazu müssten zunächst Komplementationen mit weiteren Phosphomutanten des CtIPs u.a. am Serin 327 in Artemis-depletierten Zellen durchgeführt werden. Sollte neben dem Threonin 847 auch das Serin 327 für die CtIP-vermittelte Resektion notwendig sein, würde die Komplementation mit der Serin 327-Mutante ebenfalls zum Verlust des Artemis-abhängigen Reparaturdefekts führen. Zur Identifizierung der Reihenfolge der stattfindenden Phosphorylierungen müssen phospho-spezifische Antikörper für jede Phosphorylierungsstelle des CtIPs hergestellt werden. Nach Komplementation der Zellen mit den verschiedenen Phosphomutanten kann das Zellextrakt nun auf die einzelnen Phosphorylierungen hin untersucht werden. Ist z.B. das Threonin 847 die erste Phosphorylierungsstelle im CtIP und erst danach sind weitere Phosphorylierungen möglich, würde nach Komplementation mit der Phosphomutante (T847A) keine Phosphorylierung an den anderen Phosphorylierungsstellen nachweisbar sein. Weitere Phosphorylierungsstellen in der Sequenz des CtIP bilden die Serine 664 und 745. Die Phosphorylierung dieser Serine erfolgt als Antwort auf DNA-Schäden in Abhängigkeit von ATM (Li et al 2000, Wu und Lee 2006). Erneut sollen Komplementationsstudien mit Phosphomutanten an diesen Stellen in siRNA-behandelten Zellen Aufschluss zur Beteiligung dieser Phosphorylierungsstellen an der Resektion von DSBs in der G1- und der G2-Phase geben. Diese Studien tragen zusätzlich bei der Aufklärung der Funktion von ATM bei der Resektion der DSBs bei.

Durch die Untersuchung der Reparatur in dieser Arbeit wurden neue Einblicke auf das Zusammenspiel der HR und des NHEJs gewonnen. Diese verdeutlichen, dass eine klare Trennung der beiden Reparaturwege nicht erfolgen kann und ein Wechsel zwischen den Reparaturwegen möglich ist. Es stellt sich nun die Frage, welcher Schritt bei der Reparatur den weiteren Reparaturweg festlegt und so ein Wechsel in den anderen Reparaturweg verhindert. Die Untersuchung dieser Fragestellung ge-

währt wertvolle Einblicke in das Wechselspiel der verschiedenen Reparaturwege und wird dabei helfen, die komplexe Regulation der DNA-Reparatur besser zu verstehen.

6. Zusammenfassung/Summary

Die vorliegende Arbeit ist in zwei Fragestellungen gegliedert. Der erste Teil befasst sich mit der Funktion des Tumorsuppressors p53 am Übergang von der G2-Phase in die Mitose. Dazu wurden Zellen mit unterschiedlichem p53-Status mit ionisierender Strahlung behandelt. Anschließend wurde der G2/M-Checkpoint mit biochemischen und durchflusszytometrischen Methoden analysiert. Die Untersuchungen ergaben, dass p53 keinen Einfluss auf die Initiation des G2/M-Checkpoints hat, aber eine Funktion bei der Aufrechterhaltung des G2-Arrests aufweist. Diese Funktion scheint jedoch vom Schadensniveau abhängig zu sein. So konnte gezeigt werden, dass in p53-defizienten Zellen Strahlendosen von 1 Gy einen verlängerten G2-Arrest auslösen, während bei Strahlendosen von 12 Gy der G2/M-Checkpoint verglichen mit p53-profizienten Zellen frühzeitig aufgehoben wird. Im weiteren Verlauf der Arbeit lag das Interesse mehr auf dem verlängerten G2-Arrest nach der Applikation von 1 Gy. Untersuchungen zum Reparaturvermögen p53-defizienter Zellen zeigten, dass ein Reparaturdefekt als Grund für den verlängerten G2-Arrest ausgeschlossen werden kann. Es kann vielmehr postuliert werden, dass p53 möglicherweise auf Ebene der Checkpointkinasen Chk1/Chk2 in die DNA-Schadensantwort eingreift und so den Wiedereintritt in den Zellzyklus nach der Induktion eines geringen Schadensniveaus ermöglicht. Eine genaue Beurteilung der Funktion von p53 ist anhand der durchgeführten Experimente abschließend jedoch nicht möglich. Durch die Untersuchungen am G2/M-Checkpoint konnte für das p53 ebenfalls eine Funktion in der Mitose nach strahleninduzierten DNA-Schäden nachgewiesen werden. Die Ergebnisse liefern Hinweise darauf, dass p53 in mitotischen Zellen, deren DNA geschädigt wurde, den Übergang in die G1-Phase fördert. Diese Erkenntnis liefert Ansatzpunkte für zukünftige Arbeiten.

Der zweite Teil der Arbeit wendet sich der langsamen Komponente der DNA-Doppelstrangbruch- (DSB-) Reparatur in der G1- und G2-Phase zu. Über diese Komponente wird ein geringer Teil der strahleninduzierten DSBs beseitigt, während der Großteil der induzierten DSBs innerhalb der ersten 2 h über eine schnelle Komponente repariert wird. Untersuchungen der DSB-Reparatur in Mutanten der homologen Rekombination (HR) sowie Mutanten des Nicht-Homologen End-Joinings (NHEJs) anhand der γ H2AX-Foci-Analyse zeigten, dass in der G1-Phase die schnelle sowie die langsame Komponente über das NHEJ ablaufen. In der G2-Phase konn-

te dagegen nachgewiesen werden, dass die schnelle Reparatur über das NHEJ erfolgt, während die langsame Kinetik durch die HR gekennzeichnet ist. Weitere Untersuchungen zeigten, dass Artemis und ATM sowohl in die langsame Komponente der Reparatur in der G1- als auch in der G2-Phase involviert sind. Durch die Etablierung HR-spezifischer Nachweismethoden konnte für Artemis und ATM in der G2-Phase eine Beteiligung bei der HR aufgezeigt werden, während sie in der G1-Phase einen Weg des End-Joinings unterstützen. Die Artemis- und ATM-Abhängigkeit in der G2-Phase wird durch die Anresection der DSBs, die von CtIP vermittelt wird, herbeigeführt. Überraschenderweise zeigte sich, dass auch in der G1-Phase die Anresection der DSBs die Artemis- und ATM-Abhängigkeit hervorruft. Möglicherweise führt die Resektion der DSBs zur Ausbildung von sekundären Strukturen, die vor der Reparatur beseitigt werden müssen. Da für Artemis eine Endonukleaseaktivität beschrieben ist, kann angenommen werden, dass Artemis für die Prozessierung der Sekundärstrukturen vonnöten ist.

Einblicke zu der Funktion von ATM bei der langsamen Reparaturkomponente lieferte die Tatsache, dass DSBs, die in der G2-Phase über die HR und in der G1-Phase über einen End-Joining-Weg repariert werden, im Heterochromatin lokalisiert sind. Da für die Proteinkinase ATM beschrieben wurde, dass es den Heterochromatinbildenden Faktor Kap1 phosphoryliert und so zur Änderung des Kap1-abhängigen Heterochromatinstatus beiträgt, lässt sich vermuten, dass ATM bei der lokalen Öffnung des Heterochromatins beteiligt ist, die für eine erfolgreiche Reparatur strahleninduzierter DSBs essentiell ist. Dabei scheint die ATM-abhängige Änderung des Heterochromatinstatus für die Reparatur der resektierten DSBs von besonderer Bedeutung zu sein.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Kontrolle des G2/M-Checkpoints näher beleuchtet werden. Zudem konnten Einblicke in das komplexe Reparaturverhalten in der G2- und G1-Phase gewonnen werden. Dabei stand die langsame Reparatur im Vordergrund, die als Folge der Lokalisation im Chromatin bzw. der Anresection der DSBs abläuft und von Artemis- und ATM-abhängig ist. Diese Erkenntnisse helfen dabei, die Reparatur besser zu verstehen und bieten viele Ansatzpunkte für zukünftige Arbeiten.

This work is engaged in two different questions. The first part of this work deals with the effect of the tumor suppressor p53 on the G2/M transit. To investigate how cells with different p53 status are responding to ionizing radiation (IR) the induced G2/M checkpoint is analyzed by biochemical methods. It is shown, that p53 deficient cells have normal G2/M checkpoint induction after irradiation with 1 Gy, but cells are not released from the G2 arrest any more. So p53 seems to be important for the maintenance of the G2 arrest. This function depends on the residual damage level. In contrast to this results irradiation with 12 Gy leads to a release from the G2 arrest. The prolonged G2 arrest after the application of 1 Gy takes center stage in the further process of this work. The analysis of the repair ability of p53 deficient cells reveals that the repair capacity is not influenced and could be excluded as the reason for the prolonged G2 arrest. Instead it seems that p53 act upon the level of the DNA damage response checkpoint kinases Chk1/Chk2 whereby the cells abrogate the G2 arrest despite residual DNA damage after induction of a small amount of DSBs. A final conclusion of the exact role of p53 at the G2/M checkpoint is not possible yet. Therefore further examinations are required. From the results of the G2/M-checkpoint measurement we can conclude that p53 is important in the mitosis phase after irradiation and promotes the transit of mitotic cells with damaged DNA to the G1 phase. These results reveal a new function of p53 in the cell cycle progression after inducing DNA damage with IR. The exact mechanism of p53 during mitosis needs to be study. The second part of this work deals with the slow repair component in the G1 and G2 phase. Only a sub fraction of IR-induced DSBs are repaired with slow kinetics while the majority is repaired in the first two hours with fast kinetics. γ H2AX analysis of homologous recombination (HR) mutants and non-homologous end-joining (NHEJ) mutants show that the DSB repair occurs with the slow and fast kinetics by NHEJ in G1 phase. In G2 phase the majority of DSBs is rejoined with a fast kinetic by NHEJ while the slow kinetic represents HR. Furthermore it could be shown that Artemis and ATM are involved in the slow component in G1 as well as in G2. Since γ H2AX foci loss monitors all repair events, alternative techniques which more specifically measure HR of IR-induced DSBs are developed. These techniques show that Artemis and ATM are involved in HR in G2 whereas in G1 Artemis and ATM promote end-joining. The need of Artemis and ATM in G2 is a consequence of the CtIP-mediated resection of the DSBs. Surprisingly the analysis in G1 show, that DSB end resection generates the requirement for Artemis and ATM in the DSB repair in G1 as well as in G2,

probably due to the formation of secondary structures arising during the resection of DSBs. These structures may hinder the proper repair. Because of the well-known endonuclease activity of Artemis it is possible, that Artemis processes these secondary structures.

Further insights of the function of ATM during HR are provided by the fact that HR repairs preferentially DSBs which are localized in heterochromatic regions. Furthermore DSBs repaired with slow kinetics in G1 are also localized in heterochromatic regions. It is known that ATM phosphorylates the heterochromatic building factor Kap1. This phosphorylation contributes to the rearrangement of the Kap1 dependent heterochromatic status. So it can be postulated that ATM is involved in the chromatin remodeling, which is essential for a successful repair of IR induced DSBs. All DSBs which are located in heterochromatic regions are repaired in an ATM dependent manner. Furthermore especially the resected DSBs need the ATM dependent change of heterochromatic status.

This work allows insights into the complex network of DSB repair in G1 and G2. Taken together the results show that DSBs repaired by slow kinetics require ATM and Artemis. Strikingly all of these DSBs are resected in G1 and G2 and subsequently repaired by NHEJ and HR. The heterochromatin status or the resection capability can influence the pathway choice. These new insights aim to provide a better understanding about the repair process of IR-induced DSBs and establish new starting points for prospective works.

7. Literaturverzeichnis

- Ababou,M., Dutertre,S., Lecluse,Y., Onclercq,R., Chatton,B. & Amor-Gueret,M. 2000. ATM-dependent phosphorylation and accumulation of endogenous BLM protein in response to ionizing radiation. *Oncogene* **19**, 5955-5963.
- Adams,K.E., Medhurst,A.L., Dart,D.A. & Lakin,N.D. 2006. Recruitment of ATR to sites of ionising radiation-induced DNA damage requires ATM and components of the MRN protein complex. *Oncogene* **25**, 3894-3904.
- Ahnesorg,P., Smith,P. & Jackson,S.P. 2006. XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell* **124**, 301-313.
- Akyuz,N., Boehden,G.S., Susse,S., Rimek,A., Preuss,U., Scheidtmann,K.H. & Wiesmuller,L. 2002. DNA substrate dependence of p53-mediated regulation of double-strand break repair. *Molecular and Cellular Biology* **22**, 6306-6317.
- Arias-Lopez,C., Lazaro-Trueba,I., Kerr,P., Lord,C.J., Dexter,T., Irvani,M., Ashworth,A. & Silva,A. 2006. P53 modulates homologous recombination by transcriptional regulation of the RAD51 gene. *Embo Reports* **7**, 219-224.
- Arlander,S.J.H., Greene,B.T., Innes,C.L. & Paules,R.S. 2008. DNA protein kinase-dependent G(2) checkpoint revealed following knockdown of ataxia-telangiectasia mutated in human mammary epithelial cells. *Cancer Research* **68**, 89-97.
- Arrington,E.D., Caldwell,M.C., Kumaravel,T.S., Lohani,A., Joshi,A., Evans,M.K., Chen,H.T., Nussenzweig,A., Holbrook,N.J. & Gorospe,M. 2000. Enhanced sensitivity and long-term G2 arrest in hydrogen peroxide-treated Ku80-Null cells are unrelated to DNA repair defects. *Free Radical Biology and Medicine* **29**, 1166-1176.
- Aylon,Y., Liefshitz,B. & Kupiec,M. 2004. The CDK regulates repair of double-strand breaks by homologous recombination during the cell cycle. *Embo Journal* **23**, 4868-4875.
- Bach,S., Knockaert,M., Reinhardt,J., Lozach,O., Schmitt,S., Baratte,B., Koken,M., Coburn,S.P., Tang,L., Jiang,T., Liang,D.C., Galons,H., Dierick,J.F., Pinna,L.A., Meggio,F., Totzke,F., Schachtele,C., Lerman,A.S., Carnero,A., Wan,Y.Q., Gray,N. & Meijer,L. 2005. Roscovitine targets, protein kinases and pyridoxal kinase. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 31208-31219.
- Baek,K.H., Shin,H.J., Yoo,J.K., Cho,J.H., Choi,Y.H., Sung,Y.C., McKeon,F. & Lee,C.W. 2003. p53 deficiency and defective mitotic checkpoint in proliferating T lymphocytes increase chromosomal instability through aberrant exit from mitotic arrest. *Journal of Leukocyte Biology* **73**, 850-861.
- Baer,F.W. & Baer,R. 2001. Tumour suppressors - Effect of DNA damage on a BRCA1 complex. *Nature* **414**, 36.
- Bahassi,E.M., Conn,C.W., Myer,D.L., Hennigan,R.F., McGowan,C.H., Sanchez,Y. & Stambrook,P.J. 2002. Mammalian Polo-like kinase 3 (PIU) is a multifunctional protein involved in stress response pathways. *Oncogene* **21**, 6633-6640.
- Bahassi,E.M., Ovesen,J.L., Riesenberga,A.L., Bernstein,W.Z., Hasty,P.E. & Stambrook,P.J. 2008. The checkpoint kinases Chk1 and Chk2 regulate the functional associations between hBRCA2 and Rad51 in response to DNA damage. *Oncogene* **27**, 3977-3985.

- Bakalkin,G., Yakovleva,T., Selivanova,G., Magnusson,K.P., Szekely,L., Kiseleva,E., Klein,G., Terenius,L. & Wiman,K.G. 1994. P53 Binds Single-Stranded-Dna Ends and Catalyzes Dna Renaturation and Strand Transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 413-417.
- Bakkenist,C.J. & Kastan,M.B. 2003. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* **421**, 499-506.
- Bannister,A.J., Schneider,R., Myers,F.A., Thorne,A.W., Crane-Robinson,C. & Kouzarides,T. 2005. Spatial distribution of di- and tri-methyl lysine 36 of histone H3 at active genes. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 17732-17736.
- Barlow,J.H., Lisby,M. & Rothstein,R. 2008. Differential regulation of the cellular response to DNA double-strand breaks in G1. *Molecular Cell* **30**, 73-85.
- Baumann,P. & West,S.C. 1998. Role of the human RAD51 protein in homologous recombination and double-stranded break repair. *Trends in Biochemical Sciences* **23**, 247-251.
- Bennardo,N., Cheng,A., Huang,N. & Stark,J.M. 2008. Alternative-NHEJ Is a Mechanistically Distinct Pathway of Mammalian Chromosome Break Repair. *Plos Genetics* **4**.
- Beucher,A., Birraux,J., Tchouandong,L., Barton,O., Shibata,A., Conrad,S., Goodarzi,A.A., Krempler,A., Jeggo,P.A. & Lobrich,M. 2009. ATM and Artemis promote homologous recombination of radiation-induced DNA double-strand breaks in G2. *Embo Journal* **28**, 3413-3427.
- Binz,S.K., Sheehan,A.M. & Wold,M.S. 2004. Replication Protein A phosphorylation and the cellular response to DNA damage. *Dna Repair* **3**, 1015-1024.
- Bischof,O., Kim,S.H., Irving,J., Beresten,S., Ellis,N.A. & Campisi,J. 2001. Regulation and localization of the Bloom syndrome protein in response to DNA damage. *Journal of Cell Biology* **153**, 367-380.
- Blagosklonny,M.V. 2006. Prolonged mitosis versus tetraploid checkpoint - How p53 measures the duration of mitosis. *Cell Cycle* **5**, 971-975.
- Block,W.D., Yu,Y.P., Merkle,D., Gifford,J.L., Ding,Q., Meek,K. & Lees-Miller,S.P. 2004. Autophosphorylation-dependent remodeling of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit regulates ligation of DNA ends. *Nucleic Acids Research* **32**, 4351-4357.
- Brown,C.J., Lain,S., Verma,C.S., Fersht,A.R. & Lane,D.P. 2009. Awakening guardian angels: drugging the p53 pathway. *Nature Reviews Cancer* **9**, 862-873.
- Brown,S.W. 1966. Heterochromatin. *Science* **151**, 417-&.
- Buck,D., Malivert,L., de Chasseval,P., Barraud,A., Fondaneche,M.C., Sanal,O., Plebani,A., Stephan,J.L., Hufnagel,M., le Deist,F., Fischer,A., Durandy,A., de Villartay,J.P. & Revy,P. 2006. Cernunnos, a novel nonhomologous end-joining factor, is mutated in human immunodeficiency with microcephaly. *Cell* **124**, 287-299.
- Bulavin,D.V., Higashimoto,Y., Demidenko,Z.N., Meek,S., Graves,P., Phillips,C., Zhao,H., Moody,S.A., Appella,E., Piwnica-Worms,H. & Fornace,A.J. 2003. Dual phosphorylation controls Cdc25 phosphatases and mitotic entry. *Nature Cell Biology* **5**, 545-551.

- Bunz,F., Dutriaux,A., Lengauer,C., Waldman,T., Zhou,S., Brown,J.P., Sedivy,J.M., Kinzler,K.W. & Vogelstein,B. 1998. Requirement for p53 and p21 to sustain G(2) arrest after DNA damage. *Science* **282**, 1497-1501.
- Burma,S., Chen,B.P., Murphy,M., Kurimasa,A. & Chen,D.J. 2001. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 42462-42467.
- Carrassa,L., Broggin,M., Erba,E. & Damia,G. 2004. Chk1, but not Chk2, is involved in the cellular response to DNA damaging agents - Differential activity in cells expressing or not p53. *Cell Cycle* **3**, 1177-1181.
- Celeste,A., Fernandez-Capetillo,O., Kruhlak,M.J., Pilch,D.R., Staudt,D.W., Lee,A., Bonner,R.F., Bonner,W.M. & Nussenzweig,A. 2003. Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nature Cell Biology* **5**, 675-U51.
- Chan,T.A., Hermeking,H., Lengauer,C., Kinzler,K.W. & Vogelstein,B. 1999. 14-3-3 sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature* **401**, 616-620.
- Chen,B.P.C., Uematsu,N., Kobayashi,J., Lerenthal,Y., Krempler,A., Yajima,H., Lobrich,M., Shiloh,Y. & Chen,D.J. 2007. Ataxia telangiectasia mutated (ATM) is essential for DNA-PKcs phosphorylations at the Thr-2609 cluster upon DNA double strand break. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 6582-6587.
- Chen,G., Yuan,S.S.F., Liu,W., Xu,Y., Trujillo,K., Song,B.W., Cong,F., Goff,S.P., Wu,Y., Arlinghaus,R., Baltimore,D., Gasser,P.J., Park,M.S., Sung,P. & Lee,E.Y.H.P. 1999. Radiation-induced assembly of Rad51 and Rad52 recombination complex requires ATM and c-Abl. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 12748-12752.
- Chen,L.C., Nievera,C.J., Lee,A.Y.L. & Wu,X.H. 2008. Cell cycle-dependent complex formation of BRCA1.CtIP.MRN is important for DNA double-strand break repair. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 7713-7720.
- Chow,J.P.H., Siu,W.Y., Fung,T.K., Chan,W.M., Lau,A., Arooz,T., Ng,C.P., Yamashita,K. & Poon,R.Y.C. 2003. DNA damage during the spindle-assembly checkpoint degrades CDC25A, inhibits cyclin-CDC2 complexes, and reverses cells to interphase. *Molecular Biology of the Cell* **14**, 3989-4002.
- Chowdhury,D., Keogh,M.C., Ishii,H., Peterson,C.L., Buratowski,S. & Lieberman,J. 2005. gamma-H2AX dephosphorylation by protein phosphatase 2A facilitates DNA double-strand break repair. *Molecular Cell* **20**, 801-809.
- Clair,S.S. & Manfredi,J.J. 2006. The dual specificity phosphatase cdc25C is a direct target for transcriptional repression by the tumor suppressor p53. *Cell Cycle* **5**, 709-713.
- Clerici,M., Mantiero,D., Guerini,I., Lucchini,G. & Longhese,M.P. 2008. The Yku70-Yku80 complex contributes to regulate double-strand break processing and checkpoint activation during the cell cycle. *Embo Reports* **9**, 810-818.
- Costanzo,V., Robertson,K., Ying,C.Y., Kim,E., Avvedimento,E., Gottesman,M., Grieco,D. & Gautier,J. 2000. Reconstitution of an ATM-dependent checkpoint that inhibits chromosomal DNA replication following DNA damage. *Molecular Cell* **6**, 649-659.

- Cummings,M., Siitonen,T., Higginbottom,K., Newland,A.C. & Allen,P.D. 2002. p53-mediated downregulation of Chk1 abrogates the DNA damage-induced G2M checkpoint in K562 cells, resulting in increased apoptosis. *British Journal of Haematology* **116**, 421-428.
- D'Amours,D. & Jackson,S.P. 2002. The Mre11 complex: At the crossroads of DNA repair and checkpoint signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **3**, 317-327.
- Damia,G., Sanchez,Y., Erba,E. & Broggin,M. 2001. DNA damage induces p53-dependent down-regulation of hCHK1. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 10641-10645.
- Dasika,G.K., Lin,S.C.J., Zhao,S., Sung,P., Tomkinson,A. & Lee,E.Y.H.P. 1999. DNA damage-induced cell cycle checkpoints and DNA strand break repair in development and tumorigenesis. *Oncogene* **18**, 7883-7899.
- DeAzevedo,W.F., Leclerc,S., Meijer,L., Havlicek,L., Strnad,M. & Kim,S.H. 1997. Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues - Crystal structure of human cdk2 complexed with roscovitine. *European Journal of Biochemistry* **243**, 518-526.
- Deckbar,D., Birraux,J., Krempler,A., Tchouandong,L., Beucher,A., Walker,S., Stiff,T., Jeggo,P. & Lobrich,M. 2007. Chromosome breakage after G2 checkpoint release. *Journal of Cell Biology* **176**, 749-755.
- DeFazio,L.G., Stansel,R.M., Griffith,J.D. & Chu,G. 2002. Synapsis of DNA ends by DNA-dependent protein kinase. *Embo Journal* **21**, 3192-3200.
- Deleo,A.B., Jay,G., Appella,E., Dubois,G.C., Law,L.W. & Old,L.J. 1979. Detection of A Transformation-Related Antigen in Chemically-Induced Sarcomas and Other Transformed-Cells of the Mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**, 2420-2424.
- Denhardt,D.T., Edwards,D.R. & Parfett,C.L.J. 1986. Gene-Expression During the Mammalian-Cell Cycle. *Biochimica et Biophysica Acta* **865**, 83-125.
- Ding,Q., Reddy,Y.V.R., Wang,W., Woods,T., Douglas,P., Ramsden,D.A., Lees-Miller,S.P. & Meek,K. 2003. Autophosphorylation of the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase is required for efficient end processing during DNA double-strand break repair. *Molecular and Cellular Biology* **23**, 5836-5848.
- Dixon,H. & Norbury,C.J. 2002. Therapeutic Exploitation of Checkpoint Defects in Cancer Cells Lacking p53 Function. *Cell Cycle* **1**, 362-368.
- Donnianni,R.A., Ferrari,M., Lazzaro,F., Clerici,M., Nachimuthu,B.T., Plevani,P., Muzi-Falconi,M. & Pellicoli,A. 2010. Elevated Levels of the Polo Kinase Cdc5 Override the Mec1/ATR Checkpoint in Budding Yeast by Acting at Different Steps of the Signaling Pathway. *Plos Genetics* **6**.
- Doree,M. & Galas,S. 1994. The Cyclin-Dependent Protein-Kinases and the Control of Cell-Division .1. *Faseb Journal* **8**, 1114-1121.
- Draetta,G. & Eckstein,J. 1997. Cdc25 protein phosphatases in cell proliferation. *Biochimica et Biophysica Acta-Reviews on Cancer* **1332**, M53-M63.
- Dubin,M.J., Stokes,P.H., Sum,E.Y.M., Williams,R.S., Valova,V.A., Robinson,P.J., Lindeman,G.J., Glover,J.N.M., Visvader,J.E. & Matthews,J.M. 2004. Dimerization of CtIP, a BRCA1- and CtBP-interacting protein, is mediated by an N-terminal coiled-coil motif. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 26932-26938.

- Dunphy, W.G., Brizuela, L., Beach, D. & Newport, J. 1988. The Xenopus Cdc2 Protein Is A Component of Mpf, A Cytoplasmic Regulator of Mitosis. *Cell* **54**, 423-431.
- Dupre, A., Boyer-Chatenet, L. & Gautier, J. 2006. Two-step activation of ATM by DNA and the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Nature Structural & Molecular Biology* **13**, 451-457.
- Emmitte, K.A., Adjabeng, G.M., Andrews, C.W., Alberti, J.G.B., Bambal, R., Chamberlain, S.D., Davis-Ward, R.G., Dickson, H.D., Hassler, D.F., Hornberger, K.R., Jackson, J.R., Kuntz, K.W., Lansing, T.J., Mook, R.A., Nailor, K.E., Pobanz, M.A., Smith, S.C., Sung, C.M. & Cheung, M. 2009. Design of potent thiophene inhibitors of polo-like kinase 1 with improved solubility and reduced protein binding (vol 19, pg 1694, 2009). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **19**, 2604.
- Filippo, J.S., Sung, P. & Klein, H. 2008. Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annual Review of Biochemistry* **77**, 229-257.
- Finlay, C.A., Hinds, P.W. & Levine, A.J. 1989. The P53 Proto-Oncogene Can Act As A Suppressor of Transformation. *Cell* **57**, 1083-1093.
- Foijer, F., Wolthuis, R.M.F., Doodeman, V., Medema, R.H. & te Riele, H. 2005. Mitogen requirement for cell cycle progression in the absence of pocket protein activity. *Cancer Cell* **8**, 455-466.
- Foray, N., Marot, D., Gabriel, A., Randrianarison, V., Carr, A.M., Perricaudet, M., Ashworth, A. & Jeggo, P. 2003. A subset of ATM- and ATR-dependent phosphorylation events requires the BRCA1 protein. *Embo Journal* **22**, 2860-2871.
- Furuse, M., Nagase, Y., Tsubouchi, H., Murakami-Murofushi, K., Shibata, T. & Ohta, K. 1998. Distinct roles of two separable in vitro activities of yeast Mre11 in mitotic and meiotic recombination. *Embo Journal* **17**, 6412-6425.
- Fusco, C., Raymond, A. & Zervos, A.S. 1998. Molecular cloning and characterization of a novel retinoblastoma-binding protein. *Genomics* **51**, 351-358.
- Gebow, D., Miselis, N. & Liber, H.L. 2000. Homologous and nonhomologous recombination resulting in deletion: Effects of p53 status, microhomology, and repetitive DNA length and orientation. *Molecular and Cellular Biology* **20**, 4028-4035.
- Geng, L.Y., Zhang, X.S., Zheng, S. & Legerski, R.J. 2007. Artemis links ATM to G(2)/M checkpoint recovery via regulation of Cdk1-cyclin B. *Molecular and Cellular Biology* **27**, 2625-2635.
- Golsteyn, R.M., Mundt, K.E., Fry, A.M. & Nigg, E.A. 1995. Cell-Cycle Regulation of the Activity and Subcellular-Localization of Plk1, A Human Protein-Kinase Implicated in Mitotic Spindle Function. *Journal of Cell Biology* **129**, 1617-1628.
- Goodarzi, A.A., Yu, Y.P., Riballo, E., Douglas, P., Walker, S.A., Ye, R.Q., Harer, C., Marchetti, C., Morrice, N., Jeggo, P.A. & Lees-Miller, S.P. 2006. DNA-PK autophosphorylation facilitates Artemis endonuclease activity. *Embo Journal* **25**, 3880-3889.
- Goodarzi, A.A., Noon, A.T., Deckbar, D., Ziv, Y., Shiloh, Y., Lobrich, M. & Jeggo, P.A. 2008. ATM signaling facilitates repair of DNA double-strand breaks associated with heterochromatin. *Molecular Cell* **31**, 167-177.
- Gravel, S., Chapman, J.R., Magill, C. & Jackson, S.P. 2008. DNA helicases Sgs1 and BLM promote DNA double-strand break resection. *Genes & Development* **22**, 2767-2772.

- Graves,P.R., Lovly,C.M., Uy,G.L. & Piwnica-Worms,H. 2001. Localization of human Cdc25C is regulated both by nuclear export and 14-3-3 protein binding. *Oncogene* **20**, 1839-1851.
- Greenberg,R.A., Sobhian,B., Pathania,S., Cantor,S.B., Nakatani,Y. & Livingston,D.M. 2006. Multifactorial contributions to an acute DNA damage response by BRCA1/BARD1-containing complexes. *Genes & Development* **20**, 34-46.
- Grewal,S.I.S. & Moazed,D. 2003. Heterochromatin and epigenetic control of gene expression. *Science* **301**, 798-802.
- Gu,J., Li,S., Zhang,X., Wang,L.C., Niewolik,D., Schwarz,K., Legerski,R.J., Zandi,E. & Lieber,M.R. 2010. DNA-PKcs regulates a single-stranded DNA endonuclease activity of Artemis. *Dna Repair* doi:10.1016/j.dnarep.2010.01.001.
- Haaf,T., Golub,E.I., Reddy,G., Radding,C.M. & Ward,D.C. 1995. Nuclear Foci of Mammalian Rad51 Recombination Protein After Dna-Damage and Its Role in Cell-Death. *American Journal of Human Genetics* **57**, 815.
- Hall,E. & Giaccia,A. 2006. *Radiobiology Fort He Radiologist*. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia edn.
- Henikoff,S. 2000. Heterochromatin function in complex genomes. *Biochimica et Biophysica Acta-Reviews on Cancer* **1470**, O1-O8.
- Henner,W.D., Grunberg,S.M. & Haseltine,W.A. 1983. Enzyme Action at 3'-Termini of Ionizing Radiation-Induced Dna Strand Breaks. *Journal of Biological Chemistry* **258**, 5198-5205.
- Huang,J., Gong,Z.H., Ghosal,G. & Chen,J.J. 2009. SOSS Complexes Participate in the Maintenance of Genomic Stability. *Molecular Cell* **35**, 384-393.
- Huertas,P., Cortes-Ledesma,F., Sartori,A.A., Aguilera,A. & Jackson,S.P. 2008. CDK targets Sae2 to control DNA-end resection and homologous recombination. *Nature* **455**, 689-U86.
- Huertas,P. & Jackson,S.P. 2009. Human CtIP Mediates Cell Cycle Control of DNA End Resection and Double Strand Break Repair. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 9558-9565.
- Iijima,K., Ohara,M., Seki,R. & Tauchi,H. 2008. Dancing on Damaged Chromatin: Functions of ATM and the RAD50/MRE11/NBS1 Complex in Cellular Responses to DNA Damage. *Journal of Radiation Research* **49**, 451-464.
- Iliakis,G., Wang,H., Perrault,A.R., Boecker,W., Rosidi,B., Windhofer,F., Wu,W., Guan,J., Terzoudi,G. & Pantelias,G. 2004. Mechanisms of DNA double strand break repair and chromosome aberration formation. *Cytogenetic and Genome Research* **104**, 14-20.
- Incassati,A., Patel,D. & McCance,D.J. 2006. Induction of tetraploidy through loss of p53 and upregulation of Plk1 by human papillomavirus type-16 E6. *Oncogene* **25**, 2444-2451.
- Ira,G., Pelliccioli,A., Balijja,A., Wang,X., Fiorani,S., Carotenuto,W., Liberi,G., Bressan,D., Wan,L.H., Hollingsworth,N.M., Haber,J.E. & Foiani,M. 2004. DNA end resection, homologous recombination and DNA damage checkpoint activation require CDK1. *Nature* **431**, 1011-1017.
- Jackson,S.P. 2002. Sensing and repairing DNA double-strand breaks - Commentary. *Carcinogenesis* **23**, 687-696.

- Jazayeri,A., Falck,J., Lukas,C., Bartek,J., Smith,G.C.M., Lukas,J. & Jackson,S.P. 2006. ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nature Cell Biology* **8**, 37-U13.
- Jeggo,P.A. 1998. Identification of genes involved in repair of DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Radiation Research* **150**, S80-S91.
- Jeggo,P.A. & Lobrich,M. 2005. Artemis links ATM to double strand break rejoining. *Cell Cycle* **4**, 359-362.
- Jenuwein,T. & Allis,C.D. 2001. Translating the histone code. *Science* **293**, 1074-1080.
- Jurvansuu,J., Fragkos,M., Ingemarsdotter,C. & Beard,P. 2007. Chk1 instability is coupled to mitotic cell death of p53-deficient cells in response to virus-induced DNA damage signaling. *Journal of Molecular Biology* **372**, 397-406.
- Kao,G.D., McKenna,W.G. & Yen,T.J. 2001. Detection of repair activity during the DNA damage-induced G2 delay in human cancer cells. *Oncogene* **20**, 3486-3496.
- Kastan,M.B., Zhan,Q.M., Eldeiry,W.S., Carrier,F., Jacks,T., Walsh,W.V., Plunkett,B.S., Vogelstein,B. & Fornace,A.J. 1992. A Mammalian-Cell Cycle Checkpoint Pathway Utilizing P53 and Gadd45 Is Defective in Ataxia-Telangiectasia. *Cell* **71**, 587-597.
- Kegel,P., Riballo,E., Kuhne,M., Jeggo,P.A. & Lobrich,M. 2007. X-irradiation of cells on glass slides has a dose doubling impact. *Dna Repair* **6**, 1692-1697.
- Kim,C.S., Snyder,R.O. & Wold,M.S. 1992. Binding-Properties of Replication Protein-A from Human and Yeast-Cells. *Molecular and Cellular Biology* **12**, 3050-3059.
- Kinner,A., Wu,W.Q., Staudt,C. & Iliakis,G. 2008. gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Research* **36**, 5678-5694.
- Koida,N., Ozaki,T., Yamamoto,H., Ono,S., Koda,T., Ando,K., Okoshi,R., Kamijo,T., Omura,K. & Nakagawara,A. 2008. Inhibitory role of Plk1 in the regulation of p73-dependent apoptosis through physical interaction and phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 8555-8563.
- Kuerbitz,S.J., Plunkett,B.S., Walsh,W.V. & Kastan,M.B. 1992. Wild-Type P53 Is A Cell-Cycle Checkpoint Determinant Following Irradiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 7491-7495.
- Kuhne,M., Riballo,E., Rief,N., Rothkamm,K., Jeggo,P.A. & Lobrich,M. 2004. A double-strand break repair defect in ATM-deficient cells contributes to radiosensitivity. *Cancer Research* **64**, 500-508.
- Kumagai,A. & Dunphy,W.G. 1991. The Cdc25 Protein Controls Tyrosine Dephosphorylation of the Cdc2 Protein in A Cell-Free System. *Cell* **64**, 903-914.
- Kumagai,A., Yakowec,P.S. & Dunphy,W.G. 1998. 14-3-3 proteins act as negative regulators of the inducer Cdc25 in Xenopus egg extracts. *Molecular Biology of the Cell* **9**, 345-354.
- Lachner,M., O'Carroll,N., Rea,S., Mechtler,K. & Jenuwein,T. 2001. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* **410**, 116-120.
- Lam,M.H. & Rosen,J.M. 2004. Chk1 versus Cdc25 - Chking one's levels of cellular proliferation. *Cell Cycle* **3**, 1355-1357.

- Lane,D.P. 1992. Cancer - P53, Guardian of the Genome. *Nature* **358**, 15-16.
- le Deist,F., Poinsignon,C., Moshous,D., Fischer,A. & de Villartay,J.P. 2004. Artemis sheds new light on V(D)J recombination. *Immunological Reviews* **200**, 142-155.
- Le Gac,G., Esteve,P.O., Ferec,C. & Pradhan,S. 2006. DNA damage-induced down-regulation of human Cdc25C and Cdc2 is mediated by cooperation between p53 and maintenance DNA (cytosine-5) methyltransferase 1. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 24161-24170.
- Lechner,M.S., Begg,G.E., Speicher,D.W. & Rauscher,F.J. 2000. Molecular determinants for targeting heterochromatin protein 1-mediated gene silencing: Direct chromoshadow domain-KAP-1 corepressor interaction is essential. *Molecular and Cellular Biology* **20**, 6449-6465.
- Lenart,P., Petronczki,M., Steegmaier,M., Di Fiore,B., Lipp,J.J., Hoffmann,M., Rettig,W.J., Kraut,N. & Peters,J.M. 2007. The small-molecule inhibitor BI 2536 reveals novel insights into mitotic roles of polo-like kinase 1. *Current Biology* **17**, 304-315.
- Lengsfeld,B.M., Rattray,A.J., Bhaskara,V., Ghirlando,R. & Paull,T.T. 2007. Sae2 is an endonuclease that processes hairpin DNA cooperatively with the Mre11/Rad50/Xrs2 complex. *Molecular Cell* **28**, 638-651.
- Li,S., Ting,N.S.Y., Zheng,L., Chen,P.L., Ziv,Y., Shiloh,Y., Lee,E.Y.H.P. & Lee,W.H. 2000. Functional link of BRCA1 and ataxia telangiectasia gene product in DNA damage response. *Nature* **406**, 210-215.
- Li,X., Lee,Y.K., Jeng,J.C., Yen,Y., Schultz,D.C., Shih,H.M. & Ann,D.K. 2007. Role for KAP1 serine 824 phosphorylation and sumoylation/desumoylation switch in regulating KAP1-mediated transcriptional repression. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 36177-36189.
- Limbo,O., Chahwan,C., Yamada,Y., de Bruin,R.A.M., Wittenberg,C. & Russell,P. 2007. Ctp1 is a cell-cycle-regulated protein that functions with Mre11 complex to control double-strand break repair by homologous recombination. *Molecular Cell* **28**, 134-146.
- Liu,F. & Lee,W.H. 2006. CtIP activates its own and cyclin D1 promoters via the E2F/RB pathway during G(1)/S progression. *Molecular and Cellular Biology* **26**, 3124-3134.
- Liu,Q.H., Guntuku,S., Cui,X.S., Matsuoka,S., Cortez,D., Tamai,K., Luo,G.B., Carattini-Rivera,S., DeMayo,F., Bradley,A., Donehower,L.A. & Elledge,S.J. 2000. Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes & Development* **14**, 1448-1459.
- Lobrich,M., Rydberg,B. & Cooper,P.K. 1995. An Assay for Determining Double-Strand Break Distributions and Rejoining Quality in Specific Genome Locations. *Journal of Cellular Biochemistry* **330**.
- Löbrich,M., Shibata,A., Beucher,A., Fisher,A., Ensminger,M., Goodarzi,A.A., Barton,O. & Jeggo,P.A. 2010. γ H2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair Strengths, limitations and optimization. *Cell Cycle* **9**, 662-669.
- Lundgren,K., Walworth,N., Booher,R., Dembski,M., Kirschner,M. & Beach,D. 1991. Mik1 and Wee1 Cooperate in the Inhibitory Tyrosine Phosphorylation of Cdc2. *Cell* **64**, 1111-1122.

- Ma,Y.M., Pannicke,U., Schwarz,K. & Lieber,M.R. 2002. Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell* **108**, 781-794.
- Ma,Y.M., Schwarz,K. & Lieber,M.R. 2005a. The Artemis: DNA-PKcs endonuclease cleaves DNA loops, flaps, and gaps. *Dna Repair* **4**, 845-851.
- Ma,Y.M., Pannicke,U., Lu,H.H., Niewolik,D., Schwarz,K. & Lieber,M.R. 2005b. The DNA-dependent protein kinase catalytic subunit phosphorylation sites in human artemis. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 33839-33846.
- Macip,S., Kosoy,A., Lee,S.W., O'Connell,M.J. & Aaronson,S.A. 2006. Oxidative stress induces a prolonged but reversible arrest in p53-null cancer cells, involving a Chk1-dependent G(2) checkpoint. *Oncogene* **25**, 6037-6047.
- Mcvey,M. & Lee,S.E. 2008. MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings. *Trends in Genetics* **24**, 529-538.
- Meek,D.W. 2009. Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response? *Nature Reviews Cancer* **9**, 714-723.
- Merlo,P., Fulco,M., Costanzo,A., Mangiacasale,R., Strano,S., Blandino,G., Taya,Y., Lavia,P. & Levrero,M. 2005. A role of p73 in mitotic exit. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 30354-30360.
- Metzger,L. & Iliakis,G. 1991. Kinetics of Dna Double-Strand Break Repair Throughout the Cell-Cycle As Assayed by Pulsed Field Gel-Electrophoresis in Cho Cells. *International Journal of Radiation Biology* **59**, 1325-1339.
- Mikhailov,A., Cole,R.W. & Rieder,C.L. 2002. DNA damage during mitosis in human cells delays the metaphase/anaphase transition via the spindle-assembly checkpoint. *Current Biology* **12**, 1797-1806.
- Mimitou,E.P. & Symington,L.S. 2008. Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing. *Nature* **455**, 770-7U3.
- Mimitou,E.P. & Symington,L.S. 2008. Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing. *Nature* **455**, 770-7U3.
- Moldovan,G.L., Madhavan,M.V., Mirchandani,K.D., McCaffrey,R.M., Vinciguerra,P. & D'Andrea,A.D. 2010. DNA Polymerase POLN Participates in Cross-Link Repair and Homologous Recombination. *Molecular and Cellular Biology* **30**, 1088-1096.
- Moon,S.H., Lin,L., Zhang,X., Nguyen,T.A., Darlington,Y., Waldman,A.S., Lu,X. & Donehower,L.A. 2010. Wildtype p53-induced phosphatase 1 dephosphorylates histone variant gamma-H2AX and suppresses DNA double strand break repair. *JBC*.
- Morgan,D.O. 1995. Principles of Cdk Regulation. *Nature* **374**, 131-134.
- Morgan,S.E. & Kastan,M.B. 1997. Dissociation of radiation-induced phosphorylation of replication protein A from the S-phase checkpoint. *Cancer Research* **57**, 3386-3389.
- Morrison,C., Sonoda,E., Takao,N., Shinohara,A., Yamamoto,K. & Takeda,S. 2000. The controlling role of ATM in homologous recombinational repair of DNA damage. *Embo Journal* **19**, 463-471.

- Moshous,D., Callebaut,I., de Chasseval,R., Corneo,B., Cavazzana-Calvo,M., le Deist,F., Tezcan,I., Sanal,O., Bertrand,Y., Philippe,N., Fischer,A. & de Villartay,J.P. 2001. Artemis, a novel DNA double-strand break repair/V(D)J recombination protein, is mutated in human severe combined immune deficiency. *Cell* **105**, 177-186.
- Mueller,P.R., Coleman,T.R., Kumagai,A. & Dunphy,W.G. 1995. Myt1 - A Membrane-Associated Inhibitory Kinase That Phosphorylates Cdc2 on Both Threonine-14 and Tyrosine-15. *Science* **270**, 86-90.
- Müller,G.A. & Engeland,K. 2010. The central role of CDE/CHR promoter elements in the regulation of cell cycle-dependent gene transcription. *FEBS Journal* **277**, 877-893.
- Myers,J.S. & Cortez,D. 2006. Rapid activation of ATR by ionizing radiation requires ATM and Mre11. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 9346-9350.
- Nakada,S., Chen,G.I., Gingras,A.C. & Durocher,D. 2008. PP4 is a gamma H2AX phosphatase required for recovery from the DNA damage checkpoint. *Embo Reports* **9**, 1019-1026.
- Nicolas,E., Roumillac,C. & Trouche,D. 2003. Balance between acetylation and methylation of histone H3 lysine 9 on the E2F-responsive dihydrofolate reductase promoter. *Molecular and Cellular Biology* **23**, 1614-1622.
- Nimonkar,A.V., Ozsoy,A.Z., Genschel,J., Modrich,P. & Kowalczykowski,S.C. 2008. Human exonuclease 1 and BLM helicase interact to resect DNA and initiate DNA repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 16906-16911.
- Orre,L.M., Stenerlow,B., Dhar,S., Larsson,R., Lewensohn,R. & Lehtio,J. 2006. p53 is involved in clearance of ionizing radiation-induced RAD51 foci in a human colon cancer cell line. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **342**, 1211-1217.
- Parker,L.L. & PiwnicaWorms,H. 1992. Inactivation of the P34(Cdc2)-Cyclin-B Complex by the Human Wee1 Tyrosine Kinase. *Science* **257**, 1955-1957.
- Paull,T.T. & Gellert,M. 1998. The 3' to 5' exonuclease activity of Mre11 facilitates repair of DNA double-strand breaks. *Molecular Cell* **1**, 969-979.
- Paulson,J.R. & Taylor,S.S. 1982. Phosphorylation of Histone-1 and Histone-3 and Non-Histone High Mobility Group-14 by An Endogenous Kinase in Hela Metaphase Chromosomes. *Journal of Biological Chemistry* **257**, 6064-6072.
- Peng,C.Y., Graves,P.R., Thoma,R.S., Wu,Z.Q., Shaw,A.S. & PiwnicaWorms,H. 1997. Mitotic and G(2) checkpoint control: Regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science* **277**, 1501-1505.
- Peng,H.Z., Begg,G.E., Schultz,D.C., Friedman,J.R., Jensen,D.E., Speicher,D.W. & Rauscher,F.J. 2000. Reconstitution of the KRAB-KAP-1 repressor complex: A model system for defining the molecular anatomy of RING-B box-coiled-coil domain-mediated protein-protein interactions. *Journal of Molecular Biology* **295**, 1139-1162.
- Peters,A.H.F.M., Kubicek,S., Mechtler,K., O'Sullivan,R.J., Derijck,A.A.H.A., Perez-Burgos,L., Kohimaier,A., Opravil,S., Tachibana,M., Shinkai,Y., Martens,J.H.A. & Jenwein,T. 2003. Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Molecular Cell* **12**, 1577-1589.

- Petrini, J.H.J. & Stracker, T.H. 2003. The cellular response to DNA double-strand breaks: defining the sensors and mediators. *Trends in Cell Biology* **13**, 458-462.
- Pines, J. 1995. Cyclins and Cyclin-Dependent Kinases - A Biochemical View. *Biochemical Journal* **308**, 697-711.
- Poinsignon, C., de Chasseval, R., Soubeyrand, S., Moshous, D., Fischer, A., Hache, R.J.G. & de Villartay, J.P. 2004. Phosphorylation of Artemis following irradiation-induced DNA damage. *European Journal of Immunology* **34**, 3146-3155.
- Rana, S., Gupta, K., Gomez, J., Matsuyama, S., Chakrabarti, A., Agarwal, M.L., Agarwal, A., Agarwal, M.K. & Wald, D.N. 2010. Securinine induces p73-dependent apoptosis preferentially in p53-deficient colon cancer cells. *The FASEB Journal*.
- Rashid, S.A., Dellaire, G., Cuddihy, A., Arrowsmith, C., Lilge, L., Prise, K., Bazett-Jones, D. & Bristow, R. 2004. p53 domains necessary for recruitment to sites of DNA damage in vivo. *Radiotherapy and Oncology* **72**, S28.
- Rass, E., Grabarz, A., Plo, I., Gautier, J., Bertrand, P. & Lopez, B.S. 2009. Role of Mre11 in chromosomal nonhomologous end joining in mammalian cells. *Nature Structural & Molecular Biology* **16**, 819-U38.
- Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, N., Strahl, B.D., Sun, Z.W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C.P., Allis, C.D. & Jenuwein, T. 2000. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* **406**, 593-599.
- Reinhardt, H.C. & Yaffe, M.B. 2009. Kinases that control the cell cycle in response to DNA damage: Chk1, Chk2, and MK2. *Current Opinion in Cell Biology* **21**, 245-255.
- Resnick-Silverman, L., St Clair, S., Maurer, M., Zhao, K. & Manfredi, J.J. 1998. Identification of a novel class of genomic DNA-binding sites suggests a mechanism for selectivity in target gene activation by the tumor suppressor protein p53. *Genes & Development* **12**, 2102-2107.
- Riballo, E., Kuhne, M., Rief, N., Doherty, A., Smith, G.C.M., Recio, M.J., Reis, C., Dahm, K., Fricke, A., Krempler, A., Parker, A.R., Jackson, S.P., Gennery, A., Jeggo, P.A. & Lobrich, M. 2004. A pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, artemis, and proteins locating to gamma-H2AX foci. *Molecular Cell* **16**, 715-724.
- Richard, D.J., Bolderson, E., Cubeddu, L., Wadsworth, R.I.M., Savage, K., Sharma, G.G., Nicolette, M.L., Tsvetanov, S., McIlwraith, M.J., Pandita, R.K., Takeda, S., Hay, R.T., Gautier, J., West, S.C., Paull, T.T., Pandita, T.K., White, M.F. & Khanna, K.K. 2008. Single-stranded DNA-binding protein hSSB1 is critical for genomic stability. *Nature* **453**, 677-U13.
- Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S. & Bonner, W.M. 1998. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 5858-5868.
- Rothkamm, K. & Lobrich, M. 2003. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 5057-5062.
- Rothkamm, K., Kruger, I., Thompson, L.H. & Lobrich, M. 2003. Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Molecular and Cellular Biology* **23**, 5706-5715.

- Sablina,A.A., Agapova,L.S., Chumakov,P.M. & Kopnin,B.P. 1999. p53 does not control the spindle assembly cell cycle checkpoint but mediates G1 arrest in response to disruption of microtubule system. *Cell Biology International* **23**, 323-334.
- Sanchez,Y., Wong,C., Thoma,R.S., Richman,R., Wu,R.Q., PiwnicaWorms,H. & Elledge,S.J. 1997. Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: Linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science* **277**, 1497-1501.
- Santos-Rosa,H., Schneider,R., Bannister,A.J., Sherriff,J., Bernstein,B.E., Emre,N.C.T., Schreiber,S.L., Mellor,J. & Kouzarides,T. 2002. Active genes are trimethylated at K4 of histone H3. *Nature* **419**, 407-411.
- Sartori,A.A., Lukas,C., Coates,J., Mistrik,M., Fu,S., Bartek,J., Baer,R., Lukas,J. & Jackson,S.P. 2007. Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature* **450**, 509-5U6.
- Schaeper,U., Subramanian,T., Lim,L., Boyd,J.M. & Chinnadurai,G. 1998. Interaction between a cellular protein that binds to the C-terminal region of adenovirus E1A (CtBP) and a novel cellular protein is disrupted by E1A through a conserved PLDLS motif. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 8549-8552.
- Schultz,D.C., Friedman,J.R. & Rauscher,F.J. 2001. Targeting histone deacetylase complexes via KRAB-zinc finger proteins: the PHD and bromodomains of KAP-1 form a cooperative unit that recruits a novel isoform of the Mi-2 alpha subunit of NuRD. *Genes & Development* **15**, 428-443.
- Schultz,D.C., Ayyanathan,K., Negorev,D., Maul,G.G. & Rauscher,F.J. 2002. SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins. *Genes & Development* **16**, 919-932.
- Shim,E.Y., Ma,H.L., Oum,J.H., Yanez,Y. & Lee,S.E. 2005. The yeast chromatin remodeler RSC complex facilitates end joining repair of DNA double-strand breaks. *Molecular and Cellular Biology* **25**, 3934-3944.
- Shrivastav,M., De Haro,L.P. & Nickoloff,J.A. 2008. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Research* **18**, 134-147.
- Song,B.W. & Sung,P. 2000. Functional interactions among yeast Rad51 recombinase, Rad52 mediator, and replication protein A in DNA strand exchange. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 15895-15904.
- Sonoda,E., Hohegger,H., Saberi,A., Taniguchi,Y. & Takeda,S. 2006. Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair. *Dna Repair* **5**, 1021-1029.
- Soond,S.M., Barry,S.P., Melino,G., Knight,R.A., Latchman,D.S. & Stephanou,A. 2008. p73-mediated transcriptional activity is negatively regulated by Polo-Like Kinase 1. *Cell Cycle* **7**, 1214-1223.
- Sripathy,S.P., Stevens,J. & Schultz,D.C. 2006. The KAP1 corepressor functions to coordinate the assembly of de novo HP1-demarcated microenvironments of heterochromatin required for KRAB zinc finger protein-mediated transcriptional repression. *Molecular and Cellular Biology* **26**, 8623-8638.
- St Clair,S., Giono,L., Varmeh-Ziaie,S., Resnick-Silverman,L., Liu,W.J., Padi,A., Das-tidar,J., DaCosta,A., Mattia,M. & Manfredi,J.J. 2004. DNA damage-induced downregulation of Cdc25C is mediated by p53 via two independent mechanisms: One involves direct binding to the cdc25C promoter. *Molecular Cell* **16**, 725-736.

- Stiff,T., O'Driscoll,M., Rief,N., Iwabuchi,K., Lobrich,M. & Jeggo,P.A. 2004. ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer Research* **64**, 2390-2396.
- Strasser-Wozak,E.M.C., Hartmann,B.L., Geley,S., Sgonc,R., Bock,G., Dos Santos,A.J.O., Hattmannstorfer,R., Wolf,H., Pavelka,M. & Kofler,R. 1998. Irradiation induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in p53-deficient lymphoblastic leukemia cells without affecting Bcl-2 and Bax expression. *Cell Death and Differentiation* **5**, 687-693.
- Sturgeon,C.M., Knight,Z.A., Shokat,K.M. & Roberge,M. 2006. Effect of combined DNA repair inhibition and G(2) checkpoint inhibition on cell cycle progression after DNA damage. *Molecular Cancer Therapeutics* **5**, 885-892.
- Sturzbecher,H.W., Donzelmann,B., Henning,W., Knippschild,U. & Buchhop,S. 1996. p53 is linked directly to homologous recombination processes via RAD51/RecA protein interaction. *Embo Journal* **15**, 1992-2002.
- Sur,S., Pagliarini,R., Bunz,F., Rago,C., Diaz,L.A., Kinzler,K.W., Vogelstein,B. & Papadopoulos,N. 2009. A panel of isogenic human cancer cells suggests a therapeutic approach for cancers with inactivated p53. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 3964-3969.
- Takagi,M., Delia,D., Chessa,L., Iwata,S., Shigeta,T., Kanke,Y., Goi,K., Asada,M., Eguchi,M., Kodama,C. & Mizutani,S. 1998. Defective control of apoptosis, radiosensitivity, and spindle checkpoint in ataxia telangiectasia. *Cancer Research* **58**, 4923-4929.
- Takao,N., Kato,H., Mori,R., Morrison,C., Sonada,E., Sun,X.G., Shimizu,H., Yoshioka,K., Takeda,S. & Yamamoto,K. 1999. Disruption of ATM in p53-null cells causes multiple functional abnormalities in cellular response to ionizing radiation. *Oncogene* **18**, 7002-7009.
- Takata,K., Shimizu,T., Iwai,S. & Wood,R.D. 2006. Human DNA polymerase N (POLN) is a low fidelity enzyme capable of error-free bypass of 5S-thymine glycol. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 23445-23455.
- Takata,M., Sasaki,M.S., Sonoda,E., Morrison,C., Hashimoto,M., Utsumi,H., Yamaguchi-Iwai,Y., Shinohara,A. & Takeda,S. 1998. Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *Embo Journal* **17**, 5497-5508.
- Takisawa,H., Mimura,S. & Kubota,Y. 2000. Eukaryotic DNA replication: from pre-replication complex to initiation complex. *Current Opinion in Cell Biology* **12**, 690-696.
- Tanno,Y., Kobayashi,K., Tatsuka,M., Gotoh,E. & Takakura,K. 2006. Mitotic arrest caused by an X-ray microbeam in a single cell expressing EGFP-aurora kinase. *Radiation Protection Dosimetry* **122**, 301-306.
- Tauchi,H., Kobayashi,J., Morishima,K., van Gent,D.C., Shiraishi,T., Verkaik,N.S., vanHeems,D., Ito,E., Nakamura,A., Sonodo,E., Takata,M., Takeda,S., Matsuura,S. & Komatsu,K. 2002. Nbs1 is essential for DNA repair by homologous recombination in higher vertebrate cells. *Nature* **420**, 93-98.
- Taylor,E.M., Cecillon,S.M., Bonis,A., Chapman,J.R., Povirk,L.F. & Lindsay,H.D. 2010. The Mre11/Rad50/Nbs1 complex functions in resection-based DNA end joining in *Xenopus laevis*. *Nucleic Acids Research* **38**, 441-454.

- Thorslund,T. & West,S.C. 2007. BRCA2: a universal recombinase regulator. *Oncogene* **26**, 7720-7730.
- Toyoshima-Morimoto,F., Taniguchi,E. & Nishida,E. 2002. Plk1 promotes nuclear translocation of human Cdc25C during prophase. *Embo Reports* **3**, 341-348.
- Trujillo,K.M., Yuan,S.S.F., Lee,E.Y.H.P. & Sung,P. 1998. Nuclease activities in a complex of human recombination and DNA repair factors Rad50, Mre11, and p95. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 21447-21450.
- Tsukuda,T., Fleming,A.B., Nickoloff,J.A. & Osley,M.A. 2005. Chromatin remodelling at a DNA double-strand break site in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **438**, 379-383.
- Valerie,K. & Povirk,L.F. 2003. Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. *Oncogene* **22**, 5792-5812.
- van de Weerd,B.C.M. & Medema,R.H. 2006. Polo-like kinases - A team in control of the division. *Cell Cycle* **5**, 853-864.
- van der Burg,M., Weemaes,C.M.R., Preijers,F., Brons,P., Barendregt,B.H., van Tol,M.J.D., Hoogerbrugge,P. & van Dongen,J.J.M. 2006. B-cell recovery after stem cell transplantation of Artemis-deficient SCID requires elimination of autologous bone marrow precursor-B-cells. *Haematologica-the Hematology Journal* **91**, 1705-1709.
- van Gent,D.C. & van der Burg,M. 2007. Non-homologous end-joining, a sticky affair. *Oncogene* **26**, 7731-7740.
- vanGent,D.C., Mizuuchi,K. & Gellert,M. 1996. Similarities between initiation of V(D)J recombination and retroviral integration. *Science* **271**, 1592-1594.
- Verger,A. & Crossley,M. 2004. Chromatin modifiers in transcription and DNA repair. *Cellular and Molecular Life Sciences* **61**, 2154-2162.
- Vo,Q.N., Kim,W.J., Cvitanovic,L., Boudreau,D.A., Ginzinger,D.G. & Brown,K.D. 2005. The ATM gene is a target for epigenetic silencing in locally advanced breast cancer (vol 24, pg 1964, 2005). *Oncogene* **24**, 1964.
- Vogel,C., Kienitz,A., Hofmann,I., Muller,R. & Bastians,H. 2004. Crosstalk of the mitotic spindle assembly checkpoint with p53 to prevent polyploidy. *Oncogene* **23**, 6845-6853.
- Vorechovsky,I., Luo,L.P., Lindblom,A., Negrini,M., Webster,A.D.B., Croce,C.M. & Hammarstrom,L. 1996. ATM mutations in cancer families. *Cancer Research* **56**, 4130-4133.
- Walker,J.R., Corpina,R.A. & Goldberg,J. 2001. Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature* **412**, 607-614.
- Wang,H.Y., Wang,M.L., Wang,H.C., Bocker,W. & Iliakis,G. 2005. Complex H2AX phosphorylation patterns by multiple kinases including ATM and DNA-PK in human cells exposed to ionizing radiation and treated with kinase inhibitors. *Journal of Cellular Physiology* **202**, 492-502.
- Wang,Q.Z., Fan,S.J., Eastman,A., Worland,P.J., Sausville,E.A. & OConnor,P.M. 1996. UCN-01, a potent abrogator of G(2) checkpoint function in cancer cells with disrupted p53. *Journal of the National Cancer Institute* **88**, 956-965.

- Ward,J.F. 1988. Dna Damage Produced by Ionizing-Radiation in Mammalian-Cells - Identities, Mechanisms of Formation, and Reparability. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* **35**, 95-125.
- Ward,J.F. 1995. Radiation Mutagenesis - the Initial Dna Lesions Responsible (Vol 142, Pg 362, 1995). *Radiation Research* **143**, 355.
- Weinberg,R.A. 1995. The Retinoblastoma Protein and Cell-Cycle Control. *Cell* **81**, 323-330.
- Weterings,E., Verkaik,N.S., Bruggenwirth,H.T., Hoeijmakers,J.H.J. & van Gent,D.C. 2003. The role of DNA dependent protein kinase in synapsis of DNA ends. *Nucleic Acids Research* **31**, 7238-7246.
- Weterings,E. & Chen,D.J. 2008. The endless tale of non-homologous end-joining. *Cell Research* **18**, 114-124.
- White,D.E., Negorev,D., Peng,H.Z., Ivanov,A.V., Maul,G.G. & Rauscher,F.J. 2006. KAP1, a novel substrate for PIKK family members, colocalizes with numerous damage response factors at DNA lesions. *Cancer Research* **66**, 11594-11599.
- Wong,A.K.C., Ormonde,P.A., Pero,R., Chen,Y., Lian,L.B., Salada,G., Berry,S., Lawrence,Q., Dayananth,P., Ha,P., Tavtigian,S.V., Teng,D.H.F. & Bartel,P.L. 1998. Characterization of a carboxy-terminal BRCA1 interacting protein. *Oncogene* **17**, 2279-2285.
- Wright,G.E., Hubscher,U., Khan,N.N., Focher,F. & Verri,A. 1994. Inhibitor Analysis of Calf Thymus Dna-Polymerase-Alpha, Dna-Polymerase-Beta and Dna-Polymerase-Epsilon. *Febs Letters* **341**, 128-130.
- Wu,G.K. & Lee,W.H. 2006. CtIP, a multivalent adaptor connecting transcriptional regulation, checkpoint control and tumor suppression. *Cell Cycle* **5**, 1592-1596.
- You,Z.S., Shi,L.Z., Zhu,Q., Wu,P., Zhang,Y.W., Basilio,A., Tonnu,N., Verma,I.M., Berns,M.W. & Hunter,T. 2009. CtIP Links DNA Double-Strand Break Sensing to Resection. *Molecular Cell* **36**, 954-969.
- Yu,X., Wu,L.J.C., Bowcock,A.M., Aronheim,A. & Baer,R. 1998. The C-terminal (BRCT) domains of BRCA1 interact in vivo with CtIP, a protein implicated in the CtBP pathway of transcriptional repression. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 25388-25392.
- Yu,X. & Baer,R. 2000. Nuclear localization and cell cycle-specific expression of CtIP, a protein that associates with the BRCA1 tumor suppressor. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 18541-18549.
- Yu,X.C. & Chen,J.J. 2004. DNA damage-induced cell cycle checkpoint control requires CtIP, a phosphorylation-dependent binding partner of BRCA1 C-terminal domains. *Molecular and Cellular Biology* **24**, 9478-9486.
- Yuan,J.S. & Chen,J.J. 2009. N Terminus of CtIP Is Critical for Homologous Recombination-mediated Double-strand Break Repair. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 31746-31752.
- Yuan,S.S.F., Chang,H.L. & Lee,E.Y.H.P. 2003. Ionizing radiation-induced Rad51 nuclear focus formation is cell cycle-regulated and defective in both ATM(-/-) and c-Abl(-/-) cells. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **525**, 85-92.

- Yun,M.H. & Hiom,K. 2009. CtIP-BRCA1 modulates the choice of DNA double-strand-break repair pathway throughout the cell cycle. *Nature* **459**, 460-U184.
- Zhang,X.S., Succi,J., Feng,Z.H., Prithivirajsingh,S., Story,M.D. & Legerski,R.J. 2004. Artemis is a phosphorylation target of ATM and ATR and is involved in the G(2)/M DNA damage checkpoint response. *Molecular and Cellular Biology* **24**, 9207-9220.
- Zhang,Y., Hefferin,M.L., Chen,L., Shim,E.Y., Tseng,H.M., Kwon,Y., Sung,P., Lee,S.E. & Tomkinson,A.E. 2007. Role of Dnl4-Lif1 in nonhomologous end-joining repair complex assembly and suppression of homologous recombination. *Nature Structural & Molecular Biology* **14**, 639-646.
- Zhou,B.B.S. & Elledge,S.J. 2000. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* **408**, 433-439.
- Ziv,Y., Bielopolski,D., Galanty,Y., Lukas,C., Taya,Y., Schultz,D.C., Lukas,J., Bekker-Jensen,S., Bartek,J. & Shiloh,Y. 2006. Chromatin relaxation in response to DNA double-strand breaks is modulated by a novel ATM and KAP-1 dependent pathway. *Nature Cell Biology* **8**, 870-U142.

8. Anhang

8.1. Veröffentlichungen

Busch,C., Barton,O., Morgenstern,E., Gotz,C., Gunther,J., Noll,A. & Montenarh,M. 2007. The G(2)/M checkpoint phosphatase cdc25C is located within centrosomes. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **39**, 1707-1713.

Beucher,A., Birraux,J., Tchouandong,L., Barton,O., Shibata,A., Conrad,S., Goodarzi,A.A., Kremler,A., Jeggo,P.A. & Lobrich,M. 2009. ATM and Artemis promote homologous recombination of radiation-induced DNA double-strand breaks in G2. *Embo Journal* **28**, 3413-3427.

Löbrich,M., Shibata,A., Beucher,A., Fisher,A., Ensminger,M., Goodarzi,A.A., Barton,O. & Jeggo,P.A. 2010. γ H2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair-Strengths, limitations and optimization. *Cell Cycle* **9**, 662-669.

Shibata,A., Barton,O., Noon,A.T., Dahm,K., Deckbar,D., Goodarzi,A.A., Löbrich,M. & Jeggo,P.A. 2010. The role of ATM and the damage response mediator proteins, 53BP1 and MDC1, in the maintenance of G2/M checkpoint arrest. *submitted in Molecular Cell Biology*.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden als Tagungsbeiträge präsentiert

O. Barton, M. Montenarh, M. Löbrich (2007)
„Zur Rolle von p53 am G2/M-Checkpoint nach ionisierender Bestrahlung“
Vortrag, 10. Jahrestagung der GBS, Mainz

O. Barton, M. Löbrich (2007)
„Zelluläre Strahlenbiologie: zellbiologische Nachweismethoden nach Bestrahlung“
Vortrag, WE-Heraeus-Physikschule, Bad Honnef

O. Barton, A. Shibata, D. Deckbar, N. Rief, A. Noon, K. Dahm, A. Goodarzi, M. Löbrich and P. Jeggo (2008)
“The role of the mediator protein MDC1 in the maintenance of the G2/M checkpoint arrest and DSB repair”
Posterpräsentation, 10th Biennial Meeting of the DGDR, Berlin

O. Barton, A. Beucher, A. Shibata, P. Jeggo, M. Löbrich (2009)
“The influence of KAP1 and CtIP on the Artemis/ATM dependent DNA double-strand break repair pathway”
Vortrag, 2nd German-French DNA Repair Meeting, Konstanz

8.2. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Markus Löbrich für die Bereitstellung des interessanten und vielseitigen Themas, die umfassende Betreuung und unermüdliche Diskussionsbereitschaft, die vielen Ideen sowie die Unterstützung und Förderung, die er mir hat zuteil werden lassen.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Mathias Montenarh bedanken, der mich in den ersten anderthalb Jahren ebenfalls umfassend betreut hat und stets bereit war, mit mir zu diskutieren, so dass viele neue Ideen entstehen konnten.

Herrn Prof. Dr. Paul Layer danke ich herzlich für die freundliche Übernahme des Ko-referats.

Ein besonderer Dank gebührt allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der AG Löbrich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, den Zusammenhalt, die Hilfsbereitschaft bei Problemen und Fragen sowie für den ein oder anderen lustigen Moment während meiner Zeit hier.

Ein herzliches Dankeschön gilt den ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern der AG Montenarh am Universitätsklinikum des Saarlandes in Homburg. Danke, dass ihr mich damals so freundlich aufgenommen habt und mir darüber hinaus auch stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden habt.

Frau Dr. Verena Quennet danke ich für das unermüdliche und schnelle Korrekturlesen meiner Doktorarbeit. Nicht vergessen möchte ich aber auch alle anderen, die bereitwillig Teile dieser Arbeit gelesen und korrigiert haben. Vielen lieben Dank.

Das größte Dankeschön geht an meine Eltern und an meine Geschwister, die mich bereits während meines Studiums und auch während der Doktorarbeit immer wieder unterstützt haben. Sie haben mir stets gezeigt, dass sie an mich glauben und mir dadurch die Kraft und Zuversicht gegeben, dass ich es schaffen werde. Tausend Dank.

Ein letzter Dank gilt meinem Freund, der mich während der letzten Züge meiner Doktorarbeit sehr unterstützt hat.

8.3. Lebenslauf

Name Olivia Barton
Geburtsdatum 01.10.1981
Geburtsort Heilbad Heiligenstadt

Berufstätigkeit im Rahmen der Promotion

07/2007 - 05/2010 Technische Universität Darmstadt
Abteilung Strahlenbiologie und DNA-Reparatur –
Arbeitsgruppe Prof. Dr. M. Löbrich

Zusammenarbeit in den Arbeitsgruppen Prof. Dr. M. Löbrich und Prof. Dr. M. Montenarh

05/2006 - 06/2007 Universität des Saarlandes
Abteilung Biophysik
Arbeitsgruppe Prof. Dr. M. Löbrich

Universität des Saarlandes
Abteilung Biochemie
Arbeitsgruppe Prof. Dr. M. Montenarh

Studium

10/2001 - 03/2006 Universität Leipzig
Studienfach Biochemie
Abschluss: Diplom

Schulbildung

08/1998 - 06/2001 J.G. Lingemann Gymnasium in Heilbad Heiligenstadt
Abschluss: Abitur

07/1992 - 07/1998 Realschule Arenshausen
Abschluss: Realschulabschluss (Mittlere Reife)

09/1988 – 06/1992 Grundschule Arenshausen

8.4. Eidesstattliche Versicherung

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Darmstadt, den

(Olivia Barton)